

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO STAUDE KLOSTER

AVALIAÇÃO IN VITRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTI-HELMÍNTICO DE  
BOVINOS

CURITIBA  
2013

FERNANDO STAUDE KLOSTER

AVALIAÇÃO IN VITRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTI-HELMÍNTICO DE BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.  
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

CURITIBA  
2013

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



### PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**AVALIAÇÃO IN VITRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTI-HELMÍNTICO DE BOVINOS**” apresentada pelo Mestrando **FERNANDO STAUDE KLOSTER** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato APTO para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 27 de fevereiro de 2013.

Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento  
Presidente/Orientador

Dr. Alessandro Pelegrini Minho  
Membro

Professor Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff  
Membro



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Agrárias  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 037/2011, referente ao projeto “Desenvolvimento de antiparasitário fitoterápico para utilização na cadeia produtiva da bovinocultura”, sob a responsabilidade de Fernando Staude Kloster, na forma em que foi apresentado (uso de 1 animal da espécie bovina), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 09 de outubro de 2012.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 037/2011, regarding the project “Development of phytotherapeutic anthelmintic to use in cattle”, under the charge of Fernando Staude Kloster, in the terms it was presented (use of 1 animal of the bovine species), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on October 09, 2012.

Curitiba, 09 de outubro de 2012.

Patrick Schmidt  
Presidente

Rosangela Locatelli Dittrich  
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Setor de Ciências Agrárias  
Universidade Federal do Paraná.

*Dedico esse trabalho ao meu pai José  
Eloy, à minha mãe Livia Maria, e  
irmãos Mauricio, Angela e Claudia.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente em memória de meu pai José Eloy Gaspar Kloster, por tudo o que ele me ensinou desde minha infância. No jeito de pegar no lápis para escrever, na pronúncia das palavras, no detalhismo e jeito de tratar, cuidar e amar os animais como só ele sabia fazer.

Agradeço à minha mãe Livia Maria Staude Kloster por todas as lições ensinadas a mim em toda a minha vida até hoje. Seu jeito rígido de educar fez de mim uma pessoa de princípios os quais jamais vou deixar de usá-los até o último dia de minha vida. Sua habilidade de mestra me fez, como ela, ter a vontade de transmitir aos outros os meus conhecimentos e habilidades e assim, ampliar o interesse das pessoas pelas minhas áreas de estudo e pesquisa.

Aos meus irmãos Angela, Claudia e Mauricio por todo o apoio recebido. Sempre me perguntando como eu estava me sentindo durante esses difíceis anos cursando o mestrado. Interessados no que eu fazia e sempre me acolhendo nas horas que precisei.

À minha namorada, amiga e companheira Adriane Steuernagel por ter aguentado minhas fases difíceis às quais alteravam rapidamente meu humor e paciência durante esses dois anos. Uma pessoa pacífica e compreensiva que me deu forças para aguentar firme essa difícil jornada.

Ao meu orientador e amigo professor Dr. Marcelo Beltrão Molento pelos seus ensinamentos os quais me fizeram enxergar a vida científica e acadêmica com outros olhos. Os olhos da dedicação, seriedade e compromisso com o que se promete.

À pesquisadora Dra. Ana Carolina de Souza Chagas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo apoio técnico-científico e material. Além disso, a sua vontade de ensinar e dedicação pela pesquisa em fitoterapia foram fundamentais e sem esses recursos seria impossível realizar a presente pesquisa.

Ao pesquisador, professor Dr. Fernando de Almeida Borges pelo envio de material técnico e biológico para a realização desse experimento.

À pesquisadora, professora e amiga Dra. Juliana Bello Baron Maurer do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR pelo apoio técnico-

científico e por ajudar em minhas dificuldades com vontade, bom humor e é claro um bom café.

Ao pesquisador Dr. Adilson Sartoratto do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – Unicamp) pelo apoio técnico-científico bem como pela paciência e preocupação com o meu aprendizado na técnica de cromatografia gasosa.

À pesquisadora, professora Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA por todos os seus ensinamentos e sua paciência, dedicação, pacificidade e bom humor pra solucionar todas as minhas dúvidas.

Ao pesquisador, professor Dr. João Ernesto de Carvalho pela oportunidade de acompanhar a rotina do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA bem como pela parceria na presente pesquisa.

À pesquisadora MSc. Karin Maia Monteiro do CPQBA pelo apoio, atenção, motivação e sugestões dadas para meu trabalho.

À técnica de laboratório Sirlene Valério Tinti por toda sua atenção, preocupação, ensinamentos e ajuda no período em que estive no CPQBA.

A todos os alunos de pós-graduação que desenvolvem suas pesquisas na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica e na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA por me receberem em seus laboratórios sempre com bom humor e pela amizade construída.

Aos meus colegas de laboratório Andressa Salvadori Shaffer, Andréia Buzatti, Cristina Mayumi Sasaki Miyazaki, Daniele Bier, Fernanda Silva Fortes, Jesséa de Fátima França, Maria Angela Machado Fernandes, Lew Kan Sprenger, Ricardo José Canever e Ursula Yaeko Yoshitani pela amizade, confiança e parceria contruídas durante esses anos.

Aos cubanos: Juan Diego Mencho Ponce, Arnielis Díaz Fernández e Amilcar Arenal Cruz pela amizade e compartilhamento de conhecimentos.

À Janina Demeler (Universidade de Hannover, Alemanha) e Ray Kaplan (Universidade da Geórgia, Estados Unidos) pelo auxílio na análise estatística do presente trabalho.

Todas as pessoas acima citadas foram indispensáveis para que esse sonho se realizasse.

*“Não cruze os braços diante de uma dificuldade, pois o maior homem do mundo morreu de braços abertos.”*

Bob Marley.

*“Cair sete vezes, levantar-se oito.”*

Provérbio japonês.



## RESUMO

Os helmintos gastrintestinais de bovinos têm sido relatados como um problema na produção animal no Brasil e no mundo. O uso de anti-helmínticos no controle de endoparasitoses é uma prática comum, porém, essa utilização de forma indiscriminada pode causar efeitos negativos como o seleção de parasitos resistentes a drogas. O problema da resistência parasitária é mundial e, no Brasil, esse fenômeno tem ocorrido em muitos estados principalmente em *Cooperia sp.* e *Haemonchus sp.* Estudos em pequenos ruminantes sobre a tentativa de reversão da resistência têm crescido nos últimos anos, porém, em bovinos essa prática ainda carece de investigações. Novas metodologias têm sido estudadas para controlar as endoparasitoses como o uso de extratos vegetais. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* por meio do teste de eclodibilidade de ovos (TEO) e do teste de migração de larvas em ágar (TMLA) a atividade dos óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana*, *Carapa guianensis*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* e *Mentha piperita* sobre nematódeos gastrintestinais de bovinos. Detectou-se efeito ovicida para *E. staigeriana*, *C. martinii*, *C. schoenanthus* e *M. piperita* com as respectivas doses de 1,04; 0,22; 0,26 e 0,43 mg/mL que inibiram 50% da eclodibilidade (DL50). Efeito larvicida foi detectado em *C. martinii*, *C. schoenanthus* e *M. piperita* com DL50 de 17,47; 12,29 e 16,82 mg/mL. A cromatografia gasosa dos óleos essenciais revelou a presença de terpenos como o limoneno, geranial e neral para *E. staigeriana*, geraniol para *C. martinii*, geraniol, geranial e neral para *C. schoenanthus* e mentol para *M. piperita*. O óleo de *Carapa guianensis* apresentou ácidos graxos oleico e palmítico como principais constituintes. Testes de atividade antiproliferativa em células tumorais e normais humanas resultaram em baixa toxicidade dos óleos sugerindo uma possível segurança no uso *in vivo*, porém, testes de toxicidade em cobaias devem ser realizados. Conclui-se que os óleos essenciais de *Eucalyptus staigeriana*, *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* e *Mentha piperita* são candidatos no controle de helmintos gastrintestinais de bovinos.

Palavras-chave: parasitas, plantas, doença, medicamento.

## ABSTRACT

Gastrointestinal helminths of cattle have been reported as a problem in livestock worldwide. The anthelmintic use is a common practice, however, this erroneous use of may cause negative effects such as development of parasite resistance. This problem is worldwide and in Brazil, this phenomenon has occurred in many states with *Cooperia* sp. and *Haemonchus* sp. mainly. Studies in small ruminants about reversion of resistance have increased lately, but in cattle, more investigations are needed. New methodologies have been studied to control helminths using plant extracts. The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* activity of *Eucalyptus staigeriana*, *Carapa guianensis*, *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* and *Mentha piperita* by the egg hatch test (EHT) and larval migration in agar test (LMAT). Ovicidal effect was detected for *E. staigeriana*, *C. martinii*, *C. schoenanthus* and *M. piperita* with 1.04, 0.22, 0.26 e 0.43 mg/mL that inhibited 50% of hatching respectively (LC50). Larvicidal effect was detected in *C. martinii*, *C. schoenanthus* and *M. piperita* with LC50 of 17.47, 12.29 and 16.82 mg/mL. Gas chromatography of essential oils showed terpenes such as limonene, geranial and neral for *E. staigeriana*, geraniol for *C. martinii*, geraniol, geranial and neral for *C. schoenanthus* and mentol for *M. piperita*. *Carapa guianensis* essential oil presented oleic and palmitic fatty acids as main compounds. Antiproliferative tests in cancer and normal cells resulted in a low toxicity of essential oils suggesting safety on *in vivo* use. However, toxicity tests in rats must be performed. We concluded that *Eucalyptus staigeriana*, *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils are candidates in the control of gastrointestinal helminths of cattle.

Keywords: Parasites, plant, disease, drug.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -CINÉTICA PLASMÁTICA PARA DROGAS ANTI-HELMÍNTICAS. DROGA DE CAUDA CURTA (A) E DROGA DE CAUDA LONGA (B)..	26
FIGURA 2 -APARATO UTILIZADO PARA O TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR. A = MATERIAL UTILIZADO; B = MONTAGEM DO APARATO; C = ADIÇÃO DE ÁGUA DESTILADA; D = APARATO APÓS CONGELAMENTO.....	63
FIGURA 3 -CURVA DOSE-RESPOSTA DE <i>Eucalyptus staigeriana</i> NOS TESTES DE ECLODIBILIDADE DE OVOS (TEO) E MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR (TMLA).....	64
FIGURA 4 -RESULTADO DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE <i>Eucalyptus staigeriana</i> EM CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS HUMANAS.....	65
FIGURA 5 -CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cymbopogon martinii</i> , <i>C. schoenanthus</i> e <i>Mentha piperita</i> NOS TESTES DE ECLODIBILIDADE DE OVOS (A) E MIGRAÇÃO DE LARVAS (B) CONTRA NEMATÓDEOS DE BOVINOS.....	108
FIGURA 6 -RESULTADOS DOS TESTES DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE <i>Cymbopogon martinii</i> , <i>C. schoenanthus</i> e <i>Mentha piperita</i> SOBRE CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS HUMANAS.....	109

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CASOS DE RESISTÊNCIA EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS NAS UNIDADES FEDERATIVAS (UF) DO BRASIL.....	24
TABELA 2 - RESULTADOS DOS TESTES DE ECLODIBILIDADE DE OVOS (TEO) E MIGRAÇÃO DE LARVAS (TMLA) DE <i>Eucalyptus staigeriana</i> EM NEMATÓDEOS DE BOVINOS.....	65
TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE <i>Eucalyptus staigeriana</i> NECESSÁRIA PARA INIBIR 50% DE CRESCIMENTO CELULAR.....	65
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO EM LOGARÍTIMO DE <i>Eucalyptus staigeriana</i> NECESSÁRIA PARA INIBIR 50% DE CRESCIMENTO CELULAR.....	66
TABELA 5 - QUANTIDADE DE COMPONENTES ISOLADOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eucalyptus staigeriana</i> POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	66
TABELA 6 - RESULTADOS DOS TESTES DE ECLODIBILIDADE DE OVOS E MIGRAÇÃO LARVAR DE <i>Carapa guianensis</i> EM NEMATÓDEOS DE BOVINOS.....	86
TABELA 7 - QUANTIDADE DE COMPONENTES ISOLADOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Carapa guianensis</i> POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	87
TABELA 8 - EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE OVOS DE NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES EM TESTES DE ECLODIBILIDADE.....	87
TABELA 9 - EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE LARVAS DE NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES PELO TESTE DE DESENVOLVIMENTO LARVAR.....	88
TABELA 10 - DL 50 E 99 DOS ÓLEOS DE <i>Cymbopogon martinii</i> , <i>C. schoenanthus</i> e <i>Mentha piperita</i> NOS TESTES DE ECLODIBILIDADE DE OVOS (TEO) E MIGRAÇÃO DE LARVAS (TMLA) (mg/mL) PARA NEMATÓDEOS DE BOVINOS.....	108
TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cymbopogon martinii</i> , <i>C. schoenanthus</i> e <i>Mentha piperita</i> NECESSÁRIA PARA INIBIR 50% DE CRESCIMENTO CELULAR (GI 50 EM µg/mL).....	110

TABELA 12 -CONCENTRAÇÃO EM LOGARÍTIMO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cymbopogon martinii</i> , <i>C. schoenanthus</i> e <i>Mentha piperita</i> NECESSÁRIA PARA OCORRER 50% DE CRESCIMENTO CELULAR.....	110
---	-----

TABELA 13 -IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cymbopogon</i> <i>martinii</i> , <i>C. schoenanthus</i> e <i>Mentha piperita</i> IDENTIFICADAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	111
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	- por cento
>	- menor
<	- maior
°C	- graus Celsius
µg	- microgramas
µL	- microlitros
µM	- micromolar
µm	- micrômetro
ABA	- abamectina
ABZ	- albendazol
ANOVA	- análise de variância
BOD	- <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CG/MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas
CO <sub>2</sub>	- dióxido de carbono
DL	- dose letal
DMSO	- dimetilsulfóxido
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DORA	- doramectina
EUA	- Estados Unidos da América
eV	- elétron volts
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization</i>
G <sub>2</sub>	- fase distinta do ciclo celular
GL	- <i>growth inhibition</i>
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	- <i>inhibition concentration</i>
IR	- índices de retenção
h	- hora
HP	- <i>Hewlett Packard</i>
HaCat	- célula de queratinócito humano
HT29	- célula de adenocarcinoma coloretal
IVM	- ivermectina
K	- potássio
K562	- células eritroleucêmicas
KCl	- cloreto de potássio
kg	- quilograma
L <sub>1</sub>	- larvas de primeiro estágio
L <sub>2</sub>	- larvas de segundo estágio
L <sub>3</sub>	- larvas de terceiro estágio
LC	- <i>lethal concentration</i>
LEV	- levamisol
LMAT	- <i>larval migration in agar test</i>
Log	- logaritmo
Ltda	- limitada
m	- metro
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MCF-7	- célula de adenocarcinoma mamário

mg	- miligrama
MG	- Minas Gerais
mL	- mililitros
mm	- milímetros
MHz	- mega hertz
MOX	- moxidectina
MS	- Mato Grosso do Sul
n	- número
n <sup>o</sup>	- número
nm	- nanômetro
n.i.	- não identificado
NaCl	- cloreto de sódio
NC	- não calculado
NCI	- <i>National Cancer Institute</i>
OPG	- ovos por grama
OVCAR-3	- célula tumoral de adenocarcinoma de ovário
PC-3	- célula tumoral de adenocarcinoma prostático
PCQD	- Peso de carcaça quente direita
PVC	- cloreto de ponivinila
p	- página
R <sup>2</sup>	- coeficiente de determinação
RC	- rendimento de carcaça
RJ	- Rio de Janeiro
rpm	- rotações por minuto
RR	- homozigotos resistentes
RS	- Rio Grande do Sul
S	- fase distinta do ciclo celular
SC	- Santa Catarina
SNC	- sistema nervoso central
SP	- São Paulo
SR	- heterozigotos
SRB	- sulforrodamina B
SS	- homozigotos susceptíveis
TDL	- teste de desenvolvimento larvar
TEO	- teste de eclodibilidade de ovos
TMLA	- teste de migração de larvas em ágar
TRCOF	- teste de redução de contagem de ovos nas fezes
UF	- unidade federativa
U251	- célula tumoral de glioma
USDA	- <i>United States Department of Agriculture</i>
v	- volume
WAAVP	- <i>World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology</i>
WNF	- <i>World's natural fragrances</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 HIPÓTESE.....	17
1.2 OBJETIVO GERAL.....	17
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>2 RESISTÊNCIA DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS AOS ANTI-HELMÍNTICOS E A PESQUISA COM ÓLEOS ESSENCIAIS COMO NOVA ALTERNATIVA DE CONTROLE PARASITÁRIO.....</b>	<b>19</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	19
2.2 CICLO EVOLUTIVO.....	21
2.3 PATOGENIA.....	21
2.4 CONTROLE.....	21
2.5 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA.....	22
2.6 NOVAS ALTERNATIVAS DE CONTROLE PARASITÁRIO.....	26
2.7 FATORES DE INFLUÊNCIA EM RESULTADOS <i>IN VITRO</i> .....	31
2.8 TESTES TOXICOLÓGICOS.....	32
2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
2.10 CONCLUSÃO.....	33
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>3 ATIVIDADE OVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eucalyptus staigeriana</i> SOBRE ESTÁGIOS PRÉ-ADULTOS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS.....</b>	<b>55</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	57
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.2.1 Nematódeos de bovinos.....	58
3.2.2 Óleo essencial.....	59
3.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas (CG/MS)....	59
3.2.4 Testes <i>in vitro</i> .....	60
3.2.4.1 Recuperação de ovos.....	60
3.2.4.2 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO).....	60
3.2.4.3 Teste de migração de larvas em ágar (TMLA).....	61
3.2.4.4 Teste de toxicidade em células.....	62
3.2.5 Análise estatística.....	63
3.3 RESULTADOS.....	64
3.4 DISCUSSÃO.....	66
3.5 CONCLUSÃO.....	70
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>4 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Carapa guianensis</i> SOBRE FASES PRÉ-ADULTAS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS.....</b>	<b>79</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	81
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	83
4.2.1 Nematódeos de bovinos.....	83
4.2.2 Óleo essencial.....	83
4.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas (CG/MS)....	83
4.2.4 Testes <i>in vitro</i> .....	84
4.2.4.1 Recuperação de ovos.....	84



4.2.4.2 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO).....	84
4.2.4.3 Teste de migração de larvas em ágar (TMLA).....	85
4.2.5 Análise estatística.....	86
4.3 RESULTADOS.....	86
4.4 DISCUSSÃO.....	87
4.5 CONCLUSÃO.....	89
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>5 EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cymbopogon martinii</i>, <i>Cymbopogon schoenanthus</i> e <i>Mentha piperita</i> EM OVOS E LARVAS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS.....</b>	<b>98</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	100
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	102
5.2.1 Óleos essenciais.....	102
5.2.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas (GC-MS)....	103
5.2.3 Testes <i>in vitro</i> .....	103
5.2.3.1 Recuperação de ovos.....	103
5.2.3.2 Teste de eclodibilidade ovos (TEO).....	104
5.2.3.3 Teste de migração de larvas em ágar (TMLA).....	104
5.2.3.4 Teste de toxicidade em células.....	105
5.2.4 Análise estatística.....	106
5.4 RESULTADOS.....	106
5.5 DISCUSSÃO.....	112
5.6 CONCLUSÃO.....	118
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>121</b>
<b>VITA.....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>138</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção animal é uma importante atividade e requer conhecimentos e tecnologias para tornar essa atividade eficaz. O manejo intensivo pode favorecer o surgimento de enfermidades na bovinocultura. As doenças parasitárias, em especial as causadas por nematódeos gastrintestinais, são de grande preocupação para produtores e profissionais do setor (CAVALCANTE *et al.*, 2009).

As endoparasitoses causam uma limitação nos níveis produtivos dos animais no mundo inteiro. Em relação aos bovinos, muito embora essas enfermidades caracterizam-se por possuírem baixa mortalidade, podem ocorrer perdas com infecções subclínicas principalmente pela redução no ganho de peso resultando em um prejuízo para os produtores brasileiros (GRISI *et al.*, 2002). Geralmente, a carga parasitária em bovinos é avaliada de uma forma subjetiva, baseando-se apenas no aspecto geral do animal (RANGEL, 2003). Diferentes métodos são usados com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas enfermidades, porém, nem sempre apresentam bons resultados obrigando os produtores a escolher entre reduzir o rebanho, ou simplesmente encerrar a atividade (CAVALCANTE *et al.*, 2009).

Os nematódeos gastrintestinais de maior importância em bovinos no Brasil são as espécies de *Cooperia sp.* e *Haemonchus placei* os quais vêm apresentando um aumento no número de casos de resistência à endectocidas nos últimos anos (MELLO *et al.*, 2006; BORGES *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2011).

A elaboração de medicamentos antiparasitários representa um grande marco na indústria farmacêutica e constitui um fator indispensável quando se propõe um programa de saúde animal. Atualmente existe alta tecnologia na produção desses medicamentos, porém, não podemos afirmar da mesma forma quanto ao uso das drogas a campo. Sabe-se hoje que o uso incorreto desses compostos promove o aparecimento da resistência parasitária (MOLENTO, 2009). Outro problema a ser considerado é que o uso inadequado dos anti-helmínticos disponíveis no mercado pode ocasionar em uma grave contaminação ambiental (HERD, 1996). Desse modo, o uso de plantas vem sendo investigado na tentativa de resolver esses problemas. A fitoterapia pode ser uma alternativa eficaz para auxiliar no controle de parasitas.

As pesquisas nessa área vêm assumindo uma importante posição no estudo de produtos com efeito anti-helmíntico (SOUZA, 2003), onde testes *in vitro* são empregados para análises de extratos vegetais que possam apresentar essa atividade. Dentre esses extratos, podemos citar os óleos essenciais que são constituídos por terpenos os quais podem ser os principais compostos responsáveis por atividades antimicrobiana, antifúngica, inseticida e repelente em pesquisas no Brasil e no mundo. Estudos com óleos de plantas em parasitologia veterinária têm crescido nos últimos anos no Brasil. Há relatos de efeitos promissores em carrapatos (CHAGAS *et al.*, 2011), piolhos (BARROS *et al.*, 2012) e nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2009). Esses óleos podem ser candidatos também no controle de endoparasitas de bovinos, porém, na literatura consultada, não se encontra até o presente momento, publicações com esse tipo de extrato vegetal nessa espécie de ruminante.

## 1.1 HIPÓTESE

O estudo com óleos essenciais permite a descoberta de novos compostos bioativos para o controle de parasitas de importância veterinária.

## 1.2 OBJETIVO GERAL

Este projeto teve por objetivo geral selecionar óleos essenciais que possuam efeito anti-helmíntico sobre nematódeos gastrintestinais de bovinos por meio de testes *in vitro*.

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente projeto de pesquisa tem como objetivos específicos:

- Aperfeiçoar metodologias *in vitro* para a realização de testes com substâncias potencialmente ativas contra nematódeos gastrintestinais de bovinos;
- Avaliar por meio de testes *in vitro*, a eficácia dos óleos essenciais: *Eucalyptus staigeriana*, *Cymbopogon schoenanthus*, *Cymbopogon martinii*, *Mentha piperita*, *Carapa guianensis* sobre nematódeos gastrintestinais de bovinos;
- Avaliar a segurança de extratos vegetais por meio de estudo toxicológico;
- Determinar substâncias bioativas por meio de análise de cromatografia gasosa dos óleos essenciais;
- Propor extratos para a realização de testes *in vivo*.

## **2 RESISTÊNCIA DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS AOS ANTI-HELMÍNTICOS E A PESQUISA COM ÓLEOS ESSENCIAIS COMO NOVA ALTERNATIVA DE CONTROLE PARASITÁRIO.**

### **2.1 INTRODUÇÃO**

O Brasil é o segundo maior produtor bovino no cenário mundial fechando o ano de 2011 com 212,8 milhões de cabeças de gado, atrás da Índia, cujo rebanho é de 324,5 milhões de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Em seguida, China e Estados Unidos ocupam a terceira e quarta posição respectivamente. No Brasil as porcentagens do rebanho bovino em cada região correspondem a 34,1% no Centro-oeste, 20,3% no Norte, 18,5% no Sudeste, 13,9% no Nordeste e 13,1% no Sul. Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás são os estados de maior número de bovinos possuindo respectivamente 13,8; 11,2 e 10,2% do rebanho nacional (IBGE, 2012).

O rebanho bovino brasileiro possui dois segmentos lucrativos: a produção de leite e de carne. A soma dos valores brutos desses segmentos resulta em R\$ 67 bilhões evidenciando a importância sócioeconômica da bovinocultura no país (MAPA, 2012). Em relação à produção de carne, o Brasil, ocupando a posição de segundo lugar, encerrou o ano de 2011 produzindo 9 milhões de toneladas. As exportações de carne atingiram aproximadamente 1,5 milhão (USDA, 2013). No caso da produção leiteira, o país ocupa a quinta posição encerrando o ano de 2010 com aproximadamente 32 milhões de toneladas produzidos ficando atrás da Rússia, China, Índia e Estados Unidos (FAO, 2013).

A obtenção do sucesso na produção de bovinos depende dos manejos nutricionais, reprodutivos e sanitários adequados. Em relação ao manejo sanitário deve-se destacar o controle eficiente de parasitos como um grande desafio, pois a criação de animais resulta em inevitáveis infecções parasitárias. Diferentes sistemas de produção contribuem de várias maneiras à sobrevivência dessas infecções (RANGEL, 2003).

As verminoses gastrintestinais prejudicam o desempenho do rebanho bovino ocasionando graves danos como pode ser observado no estudo desenvolvido por Suarez e Bedotti (1991). Os autores submeteram bezerros a diferentes situações de

contaminação de pastagem, sendo um grupo localizado em um piquete de grande contaminação (grupo 1); outro grupo destinado à uma pastagem com baixa contaminação (grupo 2) e o terceiro em pasto livre de formas infectantes de helmintos gastrintestinais (grupo 3). O primeiro grupo recebeu tratamento anti-helmíntico somente quando estavam severamente doentes. O segundo foi vermifugado quando a contagem de excedia 100 ovos por grama de fezes (OPG). O terceiro era mensalmente tratado. As médias dos ganhos de peso dos grupos 2 e 3 foram de 272,0 e 279,8 kg sendo significativamente maiores que a do grupo 1 (197,9 kg). Além disso, os grupos 2 e 3 obtiveram maior peso de carcaça quente direita (PCQD) (109, 5 e 117, 5 kg) e rendimento de carcaça (RC) (56,9 e 57,3%) comparados ao grupo 1 (PCQD = 87,8 kg; RC = 55,3%).

Stromberg *et al.* (1997) relataram uma diferença significativa na taxa de prenhez entre fêmeas bovinas parasitadas tratadas com anti-helmíntico e um grupo de vacas infectadas sem tratamento. As taxas de prenhez foram de 94% e 82% respectivamente sugerindo que o problema das endoparasitoses pode afetar no desempenho reprodutivo do rebanho.

Por meio de um levantamento de dados realizado por Groos, Ryan e Ploeger (1999) com publicações envolvendo o desempenho de bovinos infectados por nematódeos gastrintestinais, concluiu-se que em 70 trabalhos de um total de 87, houve um aumento na produção de leite após o tratamento anti-helmíntico. Outro fator avaliado foi a quantidade de gordura no leite de fêmeas bovinas a qual foi maior comparada à de grupos não tratados.

Elsener, Villeneuve e DesCôteaux (2001) observaram uma diferença significativa no ganho de peso vivo entre três grupos experimentais de bezerros durante 143 dias onde os dois grupos tratados com moxidectina obtiveram um ganho de 77,7 e 73,2 kg enquanto o grupo sem tratamento obteve 57,9 kg.

Stromberg *et al.* (2012) observaram que bovinos infectados com *Cooperia punctata* apresentaram menor consumo de matéria seca bem como menor ganho de peso comparados a um grupo controle livre de parasitismo.

Diferentemente dos ectoparasitas como carrapatos e moscas, os helmintos possuem o diagnóstico dificultado justamente por não serem visualizados diretamente pelos produtores o que causa um problema na tentativa de avaliar a carga parasitária. Desse modo, o tratamento é realizado muitas vezes de forma errônea, baseando-se apenas no aspecto geral dos animais (RANGEL, 2003).

## 2.2 CICLO EVOLUTIVO

As fêmeas dos helmintos fazem postura de ovos diariamente no trato digestório de bovinos, os quais são eliminados através das fezes. Em condições ótimas (temperatura e umidade) no interior do ovo, surge a larva de primeiro estágio (L<sub>1</sub>), que ao eclodir desenvolve-se no bolo fecal até tornar-se larva de terceiro estágio (L<sub>3</sub>). Esta migra para a pastagem ao redor, onde é ingerida pelo bovino e então penetra na parede abomasal ou intestinal, ou ainda permanece entre as vilosidades onde realiza duas mudas e transforma-se em verme adulto. A fêmea adulta inicia a postura entre 21 e 28 dias após serem ingeridas no estágio L<sub>3</sub> (LIMA, W.S.L., 2008).

As espécies de helmintos que mais acometem bovinos no Brasil são *Cooperia sp.* e *Haemonchus sp.* (CEZAR; VOGEL; SANGIONI, 2008; MOLENTO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2010; ABIDU-FIGUEIREDO *et al.*, 2011; BRUHN *et al.*, 2012).

## 2.3 PATOGENIA

Infecções por *Cooperia sp.* podem reduzir a ingestão alimentar, o ganho de peso e alterar a cinética do fósforo reduzindo a ingestão do mesmo bem como a sua absorção e retenção (LOUVANDINI *et al.*, 2009; STROMBERG *et al.*, 2012). O *Haemonchus placei* é uma das espécies mais patogênicas de bovinos no Brasil. Seu parasitismo pode causar redução de peso, alterações na distribuição de albumina entre os meios extra e intravascular e anemia (GENNARI *et al.*, 1991).

## 2.4 CONTROLE

O controle das endoparasitoses está fundamentado na aplicação de medicamentos anti-helmínticos os quais duas classes são mais comumente

utilizadas como os benzimidazóis (KÖHLER, 2001) e as lactonas macrocíclicas (MELLO *et al.*, 2006). O uso desses medicamentos é crescente devido sua praticidade, facilidade de aquisição e boa relação custo-benefício (MOLENTO, 2005), porém, essa utilização realizada de forma indevida leva a resultados abaixo das expectativas, aumento do custeio da produção (CEZAR; CATTO; BIANCHIN; 2008), presença de resíduos na carne e no leite (RUYCK *et al.*, 2000; CROOKS *et al.*, 2003; KAUFMANN *et al.*, 2011; RÜBENSAM *et al.*, 2013) e seleção de parasitas resistentes (PRICHARD, 1994).

## 2.5 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA

Como definição, a resistência é um fenômeno no qual há um aumento na quantidade de parasitas que podem sobreviver a um tratamento com um composto químico (PRICHARD *et al.*, 1980). O desenvolvimento da resistência é consequência da forte pressão de seleção das drogas em populações parasitárias (MOLENTO *et al.*, 2011) e pode ocorrer contra princípios ativos da mesma classe anti-helmíntica (resistência lateral) (MELLO *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2013), diferentes grupos químicos (cruzada) (ANZIANI *et al.*, 2004) ou de três ou mais grupos (múltipla) (SOUZA *et al.*, 2008).

Alguns fatores podem promover o surgimento desse problema dentre eles o tratamento do rebanho em intervalos de tempo reduzidos; a frequente utilização de produtos de ação prolongada durante o ano; a aquisição de animais contaminados com vermes resistentes e o tratamento de todos os animais do rebanho prejudicando a sobrevivência de indivíduos susceptíveis em *refúgia* (MOLENTO, 2009). *Refugia* é o termo utilizado para designar os parasitas que não entraram em contato com uma droga anti-helmíntica por estarem livres no pasto seja na forma de ovo ou larva no momento do tratamento dos animais (VAN WYK, 2001). Indivíduos em *refugia* possuem grande importância no controle parasitário por provocar um retardo no desenvolvimento da resistência como comprovado por Martin, Le Jambre e Claxton (1981) em que ovinos, após tratamento antiparasitário, foram infectados artificialmente com larvas em *refugia*. Posteriormente, por testes *in vitro* de eclodibilidade, foi comprovado um atraso no estabelecimento da resistência.



Porém, quando uma nova infecção ocorreu utilizando menos de 5% de larvas susceptíveis, a resistência desenvolveu-se mais rapidamente. Portanto, a *refugia* deve ser considerada para o controle parasitário, pois quanto maior o tamanho da população nessa condição, mais demorado será o processo de detecção da resistência.

Para a detecção de helmintos resistentes, tem-se utilizado o teste de redução de contagem de ovos nas fezes (TRCOF) com a técnica laboratorial descrita por Gordon e Whitlock (1939) de contagem de ovos por grama de fezes (OPG). Essa metodologia é usada no mundo todo por sua simplicidade e baixo custo (SOUZA *et al.*, 2008) e consiste em uma estimativa de eficácia anti-helmíntica por meio da comparação da contagem de OPG antes e após o tratamento (COLES *et al.*, 1992). Porém, os resultados podem não estimar a real ação da droga, pois a postura de ovos nem sempre está relacionada com a verdadeira carga parasitária (TAYLOR; HUNT; GOODYEAR, 2002).

De acordo com as recomendações da *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP), para que nematódeos sejam considerados resistentes, a droga deve apresentar eficácia abaixo de 95% (COLES *et al.*, 1992). No Brasil, a portaria nº48 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece o seguinte critério: medicamento altamente efetivo (> 98%), efetivo (90 - 98%), moderadamente efetivo (80 - 89%) e insuficientemente ativo (< 80%).

Os primeiros relatos de resistência anti-helmíntica foram em ovinos (CONWAY, 1964; DRUDGE *et al.*, 1964). Em bovinos, os primeiros casos foram relatados por Eagleson e Bowie (1986).

Antes de 2004, havia poucos casos de resistência em nematódeos de bovinos e acreditava-se que esse fenômeno ainda era pouco importante para a espécie, porém, esse baixo número era devido à falta de investigação da prevalência do fenômeno (KAPLAN, 2004). Posteriormente, houve um aumento considerável no número de relatos na Nova Zelândia, Alemanha, Bélgica e Suécia em *Ostertagia sp.* (WAGHORN *et al.*, 2006; DEMELER *et al.*, 2009), na Argentina, Estados Unidos e Austrália em *Cooperia sp.* e *Haemonchus sp.* (ANZIANI *et al.*, 2004; SUAREZ; CRISTEL, 2007; GASBARRE *et al.*, 2009; LYNDAL-MURPHY *et al.*, 2010), na Escócia em *Cooperia sp.* (SARGISON; WILSON; SCOTT, 2009), na Algeria em *Trichostrongylus sp.* (BENTOUNSI; KHAZNADAR; CABARET, 2012) e no México

em *Ostertagia* sp., *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp. e *Trichostrongylus* sp. (CANUL-KU et al., 2012).

No Brasil, o primeiro caso de resistência em bovinos ocorreu no município de Bagé, Rio Grande do Sul (PINHEIRO; ECHEVARRIA, 1990) onde os autores detectaram eficácia de 60% para oxfendazol, 81% para albendazol 5 mg/kg e 88% para albendazol 7,5 mg/kg em *Haemonchus* sp. Posteriormente novos casos foram detectados no território brasileiro como apresentado na Tabela 1.

TABELA 1 - CASOS DE RESISTÊNCIA EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS NAS UNIDADES FEDERATIVAS (UF) DO BRASIL

Droga <sup>(1)</sup>	Eficácia (%)	UF <sup>(2)</sup>	Espécie	Referência
DORA	50,6	MG	<i>Cooperia; Haemonchus</i>	Rangel et al. (2005)
IVM	18,9	MG	<i>Cooperia; Haemonchus</i>	Rangel et al. (2005)
ABA	0	RS	<i>Cooperia; Haemonchus; Trychostrongylus</i>	Mello et al. (2006)
DORA	0	RS	<i>Cooperia; Haemonchus; Trychostrongylus</i>	Mello et al. (2006)
MOX	0	RS	<i>Cooperia; Haemonchus; Trychostrongylus</i>	Mello et al. (2006)
IVM	(13 - 89)	RS	<i>Cooperia; Haemonchus; Trychostrongylus</i>	Mello et al. (2006)
ABZ	(47,4 - 84,6)	SP	<i>Cooperia; Haemonchus</i>	Soutello et al. (2007)
LEV	(47,4 - 73,7)	SP	<i>Cooperia; Haemonchus</i>	Soutello et al. (2007)
IVM	(4,4 - 79,4)	SP	<i>Cooperia; Haemonchus</i>	Soutello et al. (2007)
IVM	30,9	MS	<i>Cooperia; Haemonchus</i>	Borges et al. (2008)
DORA	82,4	RJ	<i>Cooperia</i>	Cardoso, J.M.S. et al. (2008)
IVM	53,9	RJ	<i>Cooperia</i>	Cardoso, J.M.S. et al. (2008)
IVM	(0 - 74)	SC	<i>Cooperia; Haemonchus</i>	Souza, A.P. et al. (2008)
MOX	(65,2; 44,8; 81,4)	SP	<i>Cooperia; Oesophagostomum; Trichuris</i>	Condi et al. (2009)
ABA	65	RS	<i>Cooperia; Haemonchus; Trychostrongylus</i>	Cezar et al. (2010)
DORA	64	RS	<i>Cooperia; Haemonchus</i>	Cezar et al. (2010)
IVM	(28 - 69)	RS	<i>Cooperia; Haemonchus; Trychostrongylus; Ostertagia</i>	Cezar et al. (2010)
IVM	NC <sup>(3)</sup>	MG	<i>Cooperia; Haemonchus</i>	Costa et al. (2011)
IVM	(12 - 52,7)	MS	<i>Cooperia</i>	Almeida et al. (2013)

<sup>(1)</sup> ABA = Abamectina; ABZ = Albendazol; DORA = Doramectina; IVM = Ivermectina; LEV = Levamisol; MOX = Moxidectina.

<sup>(2)</sup> RS = Rio Grande do Sul; SP = São Paulo; MG = Minas Gerais; RJ = Rio de Janeiro; SC = Santa Catarina; MS = Mato Grosso do Sul.

<sup>(3)</sup> NC = Não calculada.

O aumento da população de nematódeos resistentes é praticamente inevitável devido à presença de parasitas contendo um ou mais genes responsáveis por esse problema (MOLENTO, 2005). Quando apenas um único gene confere

resistência a um grupo químico, denomina-se “monogênica” a qual ocorre em um período curto de tempo como é o caso dos benzimidazóis, pois necessita somente da mutação nas estruturas da beta-tubulina para que o fenômeno ocorra. Quando mais de um gene é necessário para controlar a resistência a qual é denominada de “poligênica”, o processo ocorre mais lentamente como no caso das lactonas macrocíclicas, onde as mutações ocorrem nos Canais de Cloro, Glicoproteína-P e Beta-tubulina (XU *et al.*, 1998; PRICHARD, 1994, 2001).

O processo de estabelecimento da resistência ocorre pela redução no número de vermes susceptíveis e aumento na quantidade de resistentes. As populações parasitárias contêm organismos homozigotos susceptíveis (SS), homozigotos resistentes (RR) e heterozigotos (SR). Em propriedades onde a resistência ainda não está presente, a quantidade de SS é alta com SR em menor número e uma pequena parcela de RR onde estes últimos são os responsáveis pelo início do processo de seleção. A partir do momento em que uma droga “X” é empregada em um tratamento anti-helmíntico, todos os SS e grande parte dos SR são eliminados permanecendo os RR. Se houver um composto eficaz contra SR, a eficiência contra SS aumentará devido a menor capacidade de sobrevivência de parasitas com alelo S, porém restarão somente os RR que influenciarão no surgimento da resistência. Uma eficácia contra apenas SS, resulta na sobrevivência dos indivíduos SR retardando o processo de estabelecimento do problema (PRICHARD, 1990).

A indústria farmacêutica faz investimentos no desenvolvimento de medicamentos com aumento da concentração de princípios ativos. Todavia, quanto maior a pressão seletiva em decorrência dessas altas concentrações, mais rápido será o processo de seleção para a resistência, pois há a eliminação total de heterozigotos e/ou homozigotos susceptíveis aos anti-helmínticos (BARGER, 1995; SMITH *et al.*, 1999).

Para que uma droga seja considerada ideal, a mesma deve possuir efeito tóxico sem deixar resíduos por um longo espaço de tempo, o que é denominado de “cauda curta” (benzimidazóis, imidazotiazóis) (Figura 1A). Por outro lado, há também produtos com o efeito “cauda longa” (lactonas macrocíclicas) (Figura 1B), que apresentam uma desvantagem, pois além de não eliminarem os parasitas resistentes, seus efeitos residuais eliminam as L<sub>3</sub> susceptíveis recém-ingridas pelo animal pós-tratamento. Desse modo, ocorre a contaminação da pastagem com ovos de parasitas resistentes enquanto os susceptíveis que estavam em *refugia* morrem

pelo contato com a ação residual da droga (BARNES; DOBSON; BARGER, 1995; HENNESSY, 1994, 1997a; MOLENTO; PRICHARD, 1999).

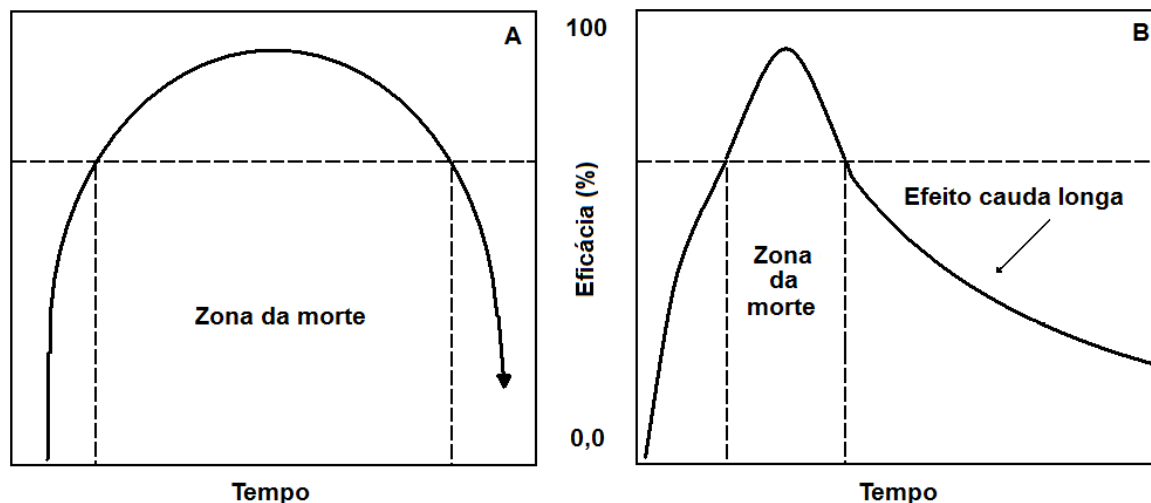


Figura 1 – Cinética plasmática para drogas anti-helmínticas. Droga de cauda curta (A) e droga de cauda longa (B).

Fonte: Hennessy (1997a); Molento (2009).

Em ovinos e caprinos, estratégias têm sido estudadas na tentativa de reverter o processo de resistência, ou seja, tornar uma população parasitária resistente em susceptível com a reversão natural, diluição de genes resistentes, retirada de animais susceptíveis e combinação de anti-helmínticos com moduladores (BORGSTEEDE; DUYN, 1989; VAN WYK; VAN SCHALKWYK, 1990; BORGES *et al.*, 2005; MOLENTO, 2009). Porém, ainda não há estudos sobre reversão em bovinos.

## 2.6 NOVAS ALTERNATIVAS DE CONTROLE PARASITÁRIO

Novas alternativas estão sendo estudadas a fim de contornar o problema da resistência e assim controlar as parasitoses gastrintestinais em ruminantes como, por exemplo, usando fungos nematófagos da espécie *Duddingtonia flagrans* (GRONVOLD *et al.*, 1993; SODER *et al.*, 2005; JOBIM *et al.*, 2008; ASSIS *et al.*, 2012; BUSKE *et al.*, 2012) *Arthrobotrys conoides* e *A. oligospora* (FALBO *et al.*, 2012; WANG, J.; WANG, R.; YANG, 2013), a utilização de raças resistentes (BRICARELLO *et al.*, 2007), a elaboração de vacinas (BASSETTO *et al.*, 2011;

PIEDRAFITA *et al.*, 2012) e o uso produtos derivados de plantas podendo ser extratos aquosos (EGUALE *et al.*, 2007, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2012), hidroalcoólicos (FRED-JAIYESIMI *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2012; AL-ROFAAI *et al.*, 2012), bem como óleos essenciais (PESSOA *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2010; KATIKI *et al.*, 2011).

Experimentos com extratos vegetais para o controle parasitário obtiveram um intenso crescimento na última década. A procura por moléculas de plantas capazes de combater agentes causadores de doenças tornou-se frequente na medicina veterinária (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2005). A utilização de produtos naturais de forma terapêutica é uma prática antiga (RATES, 2001) e obteve retorno atualmente devido algumas limitações do uso de produtos disponíveis no mercado como resíduos em alimentos e o surgimento da resistência (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2005).

O resgate dos conhecimentos populares juntamente com resultados positivos em metodologias *in vitro*, o conhecimento científico, e a elaboração de novas metodologias e de equipamentos são instrumentos aliados nessa área de pesquisa. Desse modo, podemos analisar que a área da fitoterapia ainda é muito recente e a grande diversidade de plantas que existem no país indica um amplo campo para experimentos, levantamentos, isolamentos e sínteses de produtos bioativos de origem vegetal (CHAGAS, 2008).

A busca por extratos de plantas como nova alternativa contra nematódeos gastrintestinais é mundial e importante no desenvolvimento de novas drogas (ANTHONY; FYFE; SMITH, 2005). Plantas podem oferecer novos princípios ativos por serem constituídas de compostos capazes de agir como inseticidas, antibacterianos e antiparasitários, com relatos de utilização em saúde humana e com comprovado valor medicinal ao redor do mundo (GITHIORI *et al.*, 2006; SOUZA, M.M.C. 2003).

Existem gêneros de plantas em que seus extratos possuem uma grande quantidade de estudos como, por exemplo, os gêneros *Cymbopogon* e *Mentha*.

O gênero *Cymbopogon* compreende em torno de 55 espécies de plantas sendo conhecido mundialmente e pode ser encontrado na Ásia, América do Sul, América Central, África e outros países tropicais (SHAH *et al.*, 2011). Possui um imenso valor comercial na indústria cosmética e farmacêutica e na elaboração de perfumes, sabonetes e detergentes (GANJEWALA; LUTHRA, 2010). Estudos têm

revelado muitas atividades de espécies desse gênero como antimicrobiana (SCHUCK *et al.*, 2001; SINGH, B. R. *et al.*, 2011), antifúngica (BILLERBECK *et al.*, 2001; PARANAGAMA *et al.*, 2003; ALMEIDA, R. B. A. *et al.*, 2008), antimalárica (TCHOUMBOUGNANG *et al.*, 2005), inseticida (NYAMADOR *et al.*, 2010), repelente (PHASOMKUSOLSIL; SOONWERA, 2011), anticonvulsivante (SILVA *et al.*, 2010), e antiinflamatória (FIGUEIRINHA *et al.*, 2010). A espécie *Cymbopogon martinii* já foi relatada possuindo atividade contra *Helminthosporium oryzae* (SINGH, A. K. *et al.*, 1980), *Botrytis cinerea* (WILSON *et al.*, 1997) *Aspergillus fumigatus* (BANSOD; RAI, 2008) *Microsporum gypseum* e *Trichophyton rubrum* (PRASAD *et al.*, 2009), *Saccharomyces cerevisiae* (PRASHAR *et al.*, 2003), *Candida albicans* e *Escherichia coli* (DUARTE *et al.*, 2005, 2007), *Callosobruchus chinensis* e *Tribolium castaneum* (KUMAR, R.; SRIVASTAVA; DUBEY, 2007), *Caenorhabditis elegans* (KUMARAN *et al.*, 2003) e *Haemonchus contortus* (KATIKI *et al.*, 2011). Já a espécie *Cymbopogon schoenanthus* tem sido reportada com efeito promissor contra *Callosobruchus maculatus* e *Dinamus basalis* (KETOH *et al.*, 2005, 2006) e *Plutella xylostella* (ADJRAH *et al.*, 2012). Há também estudos com atividade antimicrobiana e antioxidante (KHADHRI; MOKNI; ARAÚJO, 2011; KHADRI *et al.*, 2008, 2010) bem como anti-helmíntica (KATIKI *et al.*, 2011).

O gênero *Mentha*, o qual pretence à família Lamiaceae, possui mais de 25 espécies podendo ser encontradas na Europa, Ásia e África do sul (LANGE; CROTEAU, 1999) as quais possuem característica de serem importantes economicamente para uso na indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica (KANATT; CHANDER; SHARMA, 2007). Diversas pesquisas relataram efeito antimicrobiano e antioxidante (OUMZIL *et al.*, 2002; DORMAN *et al.*, 2003; MIMICA-DUKIC *et al.*, 2003; GULLUCE *et al.*, 2007; KANATT; CHANDER; SHARMA, 2007; MAHBOUBI; HAGHI, 2008) assim como antiviral (ALI *et al.*, 1996), inseticida (TRABOULSI *et al.*, 2002; PAVELA, 2005, 2008), antifúngico (ADAM *et al.*, 1998; SOKOVIC *et al.*, 2009; DZAMIC *et al.*, 2010), repelente (PAPACHRISTOS; STAMOPOULOS, 2002; TOLOZA *et al.*, 2006) e anti-helmíntico (MACEDO *et al.*, 2012). Pesquisas com a espécie *Mentha piperita* têm revelado eficácia contra espécies de *Aedes* e *Culex* (ANSARI *et al.*, 2000; YANG; MA, 2005; ERLER; ULUG; YALCINKAYA, 2006; KUMAR, S.; WAHAB; WARIKOO, 2011), *Trichophyton metagrophytes*, *T. rubrum* e *T. tonsurans* (SOKOVIC *et al.*, 2006), *Musca domestica* (KUMAR, P. *et al.*, 2011; MOREY; KHANDAGLE, 2012), *Bovicola* (*Werneckiella*)

*ocellatus* (TALBERT; WALL, 2012), *Candida sp.* (HÖFLING *et al.*, 2010), Herpes virus tipos 1 e 2 (SCHUHMACHER; REICHLING; SCHNITZLER, 2003; NOLKEMPER *et al.*, 2006), *Pseudomonas fluorescens* (TYAGI; MALIK, 2010), *Echinococcus granulosus* (MAGGIORE *et al.*, 2012) e *Haemonchus contortus* (KATIKI *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2012).

Os princípios ativos de vegetais são produzidos, na sua maioria, através do metabolismo secundário. Até onde se sabe, não são essenciais no desenvolvimento e crescimento da planta, mas sim para a mesma sobreviver e manter sua espécie no ecossistema. As funções fisiológicas desses princípios ativos estão pouco esclarecidas, porém a sua produção está associada à defesa do vegetal contra agentes externos (pragas, doenças, herbívoros e radiação solar) (BIESKI, 2005)

Os óleos essenciais são produtos extraídos de vegetais por meio das técnicas de arraste a vapor ou prensagem do pericarpo de frutas cítricas. Esses óleos possuem em sua composição os terpenos e fenilpropanóides e são muito utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (BIZZO, 2006).

Pesquisas têm relatado atividades biológicas desses óleos como antimicrobiana (KANG *et al.*, 1992; FRIEDMAN *et al.*, 2004), repelente (MIOT *et al.*, 2004; ERLER *et al.*, 2006) inseticida (MENDONÇA *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2010; ALZOGARAY *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2012) acaricida (FARIAS *et al.*, 2007; CHAGAS *et al.*, 2011), antifúngica (LIMA, O.L. *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2006; ZUZARTE *et al.*, 2012) e antiviral (SIVROPOULOU *et al.*, 1997; SÖKMEN *et al.*, 2004).

A investigação de óleos essenciais para o tratamento de endoparasitoses é crescente no Brasil e no mundo havendo relatos de susceptibilidade de *Haemonchus contortus* aos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Croton zehntneri*, *Lippia sidoides*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus staigeriana*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* e *Mentha piperita* os quais obtiveram concentrações capazes de inibir mais de 95% da eclodibilidade de ovos e do desenvolvimento larvar (PESSOA *et al.*, 2002; CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2009; MACEDO *et al.*, 2010; KATIKI *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2012). Nesses trabalhos, terpenos foram identificados sugerindo serem responsáveis pelo efeito anti-helmíntico podendo interagir nas várias fases de desenvolvimento do parasita (MARIE-MAGDELEINE *et al.*, 2009; KATIKI *et al.*, 2011).

Efeitos promissores de terpenos em agentes infecciosos e parasitários têm sido relatados como no caso do citral, limoneno, geraniol e mentol. O citral é um composto formado pela mistura de duas substâncias denominadas geraniol e neral e estudado como anti-helmíntico em larvas de terceiro estágio de *Anisakis simplex* (HIERRO; VALERO; NAVARRO, 2006), como inibidor da diferenciação de forma epimastigota para trypomastigota (metaciclogênese) em *Trypanosoma cruzi* (CARDOSO, J.; SOARES, 2010) e como indutor da apoptose em formas promastigotas de espécies de *Leishmania* (MACHADO *et al.* 2012). O limoneno é o principal componente de frutos do gênero *Citrus sp.* e usado como ingrediente em produtos cosméticos bem como aditivo em alimentos (KARR; COATS, 1988). Esse composto obteve eficácia contra *Actinomyces naeslundii* (KANG *et al.*, 1992) e *Ascaridia galli* (ABDELQADER *et al.*, 2012). O geraniol possui relatos de atividades contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (BARD *et al.*, 1988; MARUYAMA *et al.*, 2008), *Caenorhabditis elegans* (KUMARAN *et al.*, 2003) e *Salmonella typhimurium* (KIM, J. M. *et al.*, 2006). O mentol é um produto natural da hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e possui relatos com bioatividade contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (NOVELINO; DAEMON; SOARES, 2007), *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (TROMBETTA *et al.*, 2005; QIU *et al.*, 2011) e *Tetranychus urticae* (BADAWEY; EL-ARAMI; ABDELGALEIL, 2010).

Os estudos acima citados com *Anisakis simplex*, *Ascaridia galli* e *Caenorhabditis elegans* sugerem que os terpenos sejam responsáveis por possuírem efeito anti-helmíntico. Dessa forma, os estudos com óleos essenciais tornam-se importantes para o descobrimento e desenvolvimento de novas formulações as quais podem contribuir no controle de nematódeos gastrintestinais de bovinos.

Por enquanto não há um medicamento a base de plantas que esteja cientificamente validado contra verminoses em animais, porém o esforço para isso é notório e metodologias que possibilitam o descobrimento de substâncias de interesse antiparasitário vêm sendo estudadas, adaptadas e padronizadas (VON SAMSOM-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2009; DEMELER *et al.*, 2010a, 2010b, 2012). Essas técnicas permitem avaliar se um composto vegetal ou químico interfere no embrionamento e eclosão de ovos, desenvolvimento, motilidade e alimentação larvar (COLES *et al.*, 1992; HUBERT; KERBOEUF, 1992; D'ASSONVILLE; JANOSKY; VERSTER, 1996; MOLENTI; PRICHARD, 2001; ÁLVAREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2005).



## 2.7 FATORES DE INFLUÊNCIA EM RESULTADOS *IN VITRO*

Trabalhos realizados por diferentes grupos de pesquisa utilizando uma mesma espécie de planta têm demonstrado diferença entre valores de eficácia (KATIKI *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2012)

Essa diferença pode ocorrer devido aos diferentes protocolos de colheita, extração e estocagem da planta; época de colheita; variações climáticas e ambientais; variabilidade genética; metodologia *in vitro* utilizada.

Diferentes métodos de colheita podem resultar em mudanças na composição vegetal e consequentemente no efeito biológico. Githiori *et al.* (2004) testaram o efeito de *Azadirachta indica* em ovinos infectados com *Haemonchus contortus*. A determinação da eficácia foi realizada pelo TRCOF onde não houve efeito anti-helmíntico. Porém, Chadrawathani *et al.* (2002) observaram redução de OPG em ovinos tratados com a mesma planta. No primeiro trabalho, folhas de *A. indica* foram colhidas e estocadas antes de fornecer aos animais. No segundo, os autores forneceram logo após a colheita. Essa diferença no efeito anti-helmíntico pode ter ocorrido pela estocagem a qual poderia ter afetado a composição vegetal.

Variações ambientais e nas diferentes estações do ano podem afetar propriedades físicas e químicas dos vegetais como observado por Cerqueira *et al.* (2009) onde relataram a influência do clima na composição do óleo de folhas de *Myrcia salzmannii* colhidas em fevereiro e outubro. Houve diferenças qualitativas e quantitativas entre as composições dos óleos. Pela colheita de fevereiro 15 substâncias foram detectadas enquanto em outubro foram apenas 9. O teor de beta-cariofileno, o principal constituinte do óleo, foi de 41,5%, e 24,1% respectivamente. Dos 15 componentes detectados em fevereiro, 11 não foram identificados na análise realizada em outubro.

Carvalho Filho *et al.* (2006) avaliaram o efeito do horário de colheita, temperatura e tempo de secagem do óleo essencial de *Ocimum basilicum*. Houve uma redução na concentração de eugenol de 41,20% (folhas frescas) para 9,49% (folhas secas a 60 °C) durante o processo de secagem. Por outro lado, o teor de linalool foi de 45,18% para folhas frescas e de 86,80% para folhas submetidas à secagem por 5 dias.

Roca-Pérez *et al.* (2004) observaram que folhas de *Digitalis obscura* apresentaram concentrações de cardenólídeos muito baixas no período da primavera com um brusco aumento no verão e novamente decréscimo no outono.

## 2.8 TESTES TOXICOLÓGICOS

Há também a importância de estudos toxicológicos, já que o uso direto de extratos vegetais em animais sem a obtenção de um conhecimento prévio pode acarretar em consequências sérias para o animal. Testes *in vitro* de toxicidade em células são importantes para a seleção de substâncias bioativas servindo de apoio para descoberta de efeitos tóxicos em organismos vivos (MORALES, 2008). A metodologia descrita por Monks *et al.* (1991) avalia o efeito antiproliferativo de substâncias em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas pelo teste da sulforrodamina B (SBR) pela análise do crescimento celular. Alguns estudos relatam atividades antitumoral e antimicrobiana de plantas sem afetar células saudáveis humanas sugerindo uma possível segurança no uso em mamíferos (ITHARAT *et al.*, 2004; PEIXOTO, 2010). Entretanto, testes toxicológicos em cobaias devem ser realizados. Carvalho *et al.* (2012) testaram o efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* em ratos artificialmente infectados pelo nematódeo *Strongyloides venezuelensis* obtendo redução de 74,4 e 76,8% carga parasitária adulta nas concentrações de 150 e 250 mg/kg. Apesar dessa interessante redução, os autores relataram efeito sedativo do óleo nos animais.

## 2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um importante quesito é a diferenciação entre a resistência e a falta de eficácia. O médico veterinário deve estar atento ao uso de drogas sintéticas observando alguns detalhes como a data de validade de um medicamento; o armazenamento que deve ser de acordo com as recomendações do fabricante para se evitar possíveis alterações em sua composição e com isso diminuir sua eficiência;

a medicação por via oral deve receber atenção quanto à posição da cabeça do animal o que interfere na abertura e fechamento da goteira esofágica e por fim, o uso concomitante de anti-helmínticos com outras drogas. Um estudo feito por Areskog *et al.* (2012) concluiu que animais tratados com dexametasona apresentaram menores níveis plasmáticos de ivermectina comparados ao grupo controle.

Apesar de alguns resultados *in vitro* serem interessantes, deve-se levar em conta que esses testes podem não refletir no efeito *in vivo*.

## 2.10 CONCLUSÃO

Os nematódeos gastrintestinais são considerados um entrave tanto no cenário nacional como internacional na produção pecuária. O problema dessas enfermidades atinge propriedades pelo fácil acesso e custo. A tentativa de reversão da resistência parasitária ainda carece de mais estudos e, por isso, o controle deve ser orientado por profissionais qualificados.

Os médicos veterinários têm o dever de orientar produtores sobre metodologias de controle parasitário, com o objetivo de reduzir o uso intensivo de anti-helmínticos na tentativa de desacelerar o processo de resistência, bem como a contaminação ambiental.

As pesquisas com novas alternativas são empolgantes. Alguns resultados já demonstrados indicam um futuro promissor no controle de nematódeos gastrintestinais de ruminantes, porém, deve-se ter cautela quanto ao uso *in vivo* devido aos efeitos tóxicos. Dessa forma, avaliações toxicológicas são de extrema importância para posteriormente estudar os efeitos dos óleos essenciais em animais.

## REFERÊNCIAS

- ABDELQADER, A. *et al.* Anthelmintic effects of citrus peels enthanolic extracts against *Ascaridia galli*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 188, n. 1-2, p. 78-84, 2012.
- ABIDU-FIGUEIREDO, M. *et al.* Diagnóstico de larvas de primeiro estágio de nematóides gastrintestinais de bezerros leiteiros do município de Paty do Alferes-RJ. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 313-318, 2011.
- ADAM, K. *et al.* Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 5, p. 1739-1745, 1998.
- ADJRAH, Y. *et al.* Efficacy of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (Poaceae) extracts on diamondback moth damaging cabbage. **Journal of Biofertilizers and Biopesticides**, Los Angeles, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2012.
- AHMED, M.; LAING, M. D.; NSAHLAI, I. V. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* from sheep. **Journal of Helminthology**. Disponível em: <[http://journals.cambridge.org/article\\_S0022149X1200020X](http://journals.cambridge.org/article_S0022149X1200020X)>. Acesso em: 25/11/2012.
- AL-ROFAAI, A. *et al.* *In vitro* activity of neem (*Azadirachta indica*) and cassava (*Manihot esculenta*) on three pre-parasitic stages of susceptible and resistant strains of *Teladorsagia* (*Ostertagia*) *circumcincta*. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v. 188, n. 1-2, p. 85-92, 2012.
- ALI, A. M. *et al.* Antiviral and cytotoxic activities of some plants used in Malaysian indigenous medicine. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, Serdang, v. 19, n. 2-3, p. 129-136, 1996.
- ALMEIDA, R. B. A. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf sobre *Candida spp.* **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 37, n. 2, p. 147-153, 2008.
- ALMEIDA, G. D. *et al.* Ivermectin and moxidectin resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of *Cooperia spp.* in beef cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 191, n. 1-2, p. 59-65, 2013.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A. *et al.* The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 56-61, 2005.

ALZOGARAY, R. A. *et al.* Insecticidal activity of essential oils from eleven *Eucalyptus* spp. and two hybrids: lethal and sublethal effects of their major components on *Blatella germanica*. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 2, p. 595-600, 2011.

ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 462-468, 2005.

ANSARIA, M. A. *et al.* Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. **Bioresource Technology**, Nova Iorque, v. 71, n. 3, p. 267-271, 2000.

ANZIANI, O. S. *et al.* Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 303-306, 2004.

ARESKOG, M. *et al.* Dexamethasone treatment interferes with the pharmacokinetics of ivermectin in young cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, n. 3-4, p. 482-488, 2012.

ASSIS, R. C. L. *et al.* Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 132, n. 3, p. 482-488, 2012.

BADAWY, M. E.; EL-ARAMI, S. A.; ABDELGALEIL, S. A. Acaricidal and quantitative structure activity relationship of monoterpenes against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 52, n. 3, p. 261-274, 2010.

BARD, M. *et al.* Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, Chicago, v. 23, n. 6, p. 534-538, 1988.

BARGER, I. A. Control strategies minimizing the use of anthelmintics, In: SHEEP AND BEEF CATTLE SEMINAR, 25, 1995, Palmerston North, New Zealand. **Anais...** Palmerston: Massey University, 1995. p. 59-66.

BARNES, E. H.; DOBSON, R. J.; BARGER, I. A. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 56-63, 1995.

BARROS F. N. *et al.* *In vitro* efficacy of oil from the seed of *Carapa guianensis* (andiroba) in the control of *Felicola subrostratus*. **Brasilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 22, n. 5, p. 1130-1133, 2012.

BASSETO, C. C. *et al.* Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 377-381, 2011.

BENTOUNSI, B.; KHAZNADAR, A.; CABARET, J. Resistance of *Trichostrongylus* spp. (Nematoda) to benzimidazole in Algerian cattle herds grazed with sheep. **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 2, p. 1021-1023, 2012.

BIESKI, I. G. C. **Plantas Medicinais e Aromáticas no Sistema Único de Saúde da Região Sul de Cuiabá-MT**. 92f. Monografia (Especialização em Plantas Medicinais) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2005.

BILLERBECK, V. G. *et al.* Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 1, p. 9-17, 2001.

BIZIMENYERA, E. S. *et al.* *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabacea) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p.336-343, 2006.

BIZZO, H. R. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BORGES, F. A. *et al.* Use of verapamil to increase anthelmintic efficacy of ivermectin against drug-selected strain of *Haemonchus contortus*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 20., 2005, Christchurch, Nova Zelândia. **Proceedings...** [Christchurch: WAAVP], 2005, v. 20, D11.

BORGES, F. A. *et al.* Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25% ivermectin + 1.25% abamectin in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, n. 3-4, p. 299-307, 2008.

BORGSTEEDE, F. H. M.; DUYN, S. P. Lack of reversion of a benzimidazole resistant strain of *Haemonchus contortus* after six years of levamisole usage. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 270-272, 1989.

BRICARELLO, P. A. *et al.* Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 272-278, 2007.

BRITO, J. P. *et al.* Efeito de óleos essenciais de *Eucalyptus spp.* sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boh., 1833) (Coleoptera: Bruchidae) e *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em duas espécies de feijões. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v. 32, n. 4, p. 573-580, 2006.

BRUHN, F. R. P. *et al.* Occurrences of *Eimeria* spp. and gastrointestinal nematodes in dairy calves in southern Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veternária**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2012.

BUSKE, R. *et al.* *In vitro* influence of temperature on the biological control activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* in sheep. **Parasitology Research**, Berlim, v. 112, n. 2, p. 473-478, 2012.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. *et al.* Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 87-106, 2005.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. *et al.* Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 288-294, 2007.

CANUL-KU, H. L. *et al.* Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 292-298, 2012.

CARDOSO, J.; SOARES, M. J. *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105 n. 8, p. 1026-1032, 2010.

CARDOSO, J. M. S. *et al.* Identification of ivermectin and doramectin-resistant *Cooperia punctata* (LINSTOW, 1907) in a dairy herd in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, p. 75-81, 2008.

CARVALHO, C. O. *et al.* The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 260-268, 2012.

CARVALHO FILHO, J. L. S. *et al.* Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2006.

CAVALCANTE, A. C. R. *et al.* **Doenças parasitárias de ovinos e caprinos: Epidemiologia e controle**. 1ª edição. Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 603p.

CERQUEIRA, M. D. *et al.* Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CEZAR A. S.; CATTO J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2083-2091, 2008.

CEZAR, A. S.; VOGEL, F. S. F.; SANGIONI, L. A. Principais gêneros de nematódeos gastrintestinais em bovinos da região centro do Rio Grande do Sul, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. **Anais...** Gramado. 2008.

CEZAR, A. S. *et al.* Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 7, p. 523-528, 2010.

CHAGAS, A. C. S. Metodologias *in vitro* para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008.

CHAGAS, A. C. S. *et al.* Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CHAGAS, A. C. S. *et al.* *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 1, p. 295-303, 2011.



CHANDRAWATHANI P. *et al.* Evaluation of the neem tree (*Azadirachta indica*) as a herbal anthelmintic for nematode parasite control in small ruminants in Malaysia. **Tropical Medicine**, Kuala Lumpur, v. 19, n. 1, p. 41-48, 2002.

COLES, G. C. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992.

COLES, G. C. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? **Veterinary Research**, Paris, v. 33, n. 5, p. 481-489, 2002.

CONDI, G. K.; SOUTELLO, R. G. V.; AMARANTE, A. F. T. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 161, n. 3-4, p. 213-217, 2009.

CONWAY, D. P. Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 25, p. 106-107, 1964.

COSTA, M. S. V. L. F. *et al.* Anthelmintic resistance in a dairy cattle farm in the state of Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2011.

CROOKS, S. R. H. *et al.* Detection of levamisole residues in bovine liver and milk by immunobiosensor. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 483, n. 1-2, p. 181-186, 2003.

CROOM, E. M. Documenting and evaluating herbal remedies. **Economic Botany**, Bronx, v. 37, n. 1, p. 13-27, 1983.

D'ASSONVILLE, J.A.; JANOVSKY, E; VERSTER, A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 61, n. 1-2, p. 73-80, 1996.

DE RUYCK, H. *et al.* Determination of anthelmintic residues in milk by high performance liquid chromatography. **Food Control**, Vurrey, v. 11, n. 3, p. 165-173, 2000.

DEMELER, J. *et al.* Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastrointestinal nematodes of cattle in Northern Europe. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 109-115, 2009.

DEMELER, J. *et al.* Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastrointestinal nematodes of cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, n. 1-2, p. 61-70, 2010.

DEMELER, J. *et al.* Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 58-64, 2010.

DEMELER, J. *et al.* Evaluation of the egg hatch assay and the larval migration inhibition assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 61, n. 4, p. 614-618, 2012.

DORMAN, H. J. D. *et al.* Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.

DRUDGE, J. H. *et al.* Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 25, p. 1512-1518, 1964.

DUARTE, M. C. T. *et al.* Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

DUBEY, V. S.; LUTHRA, R. Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. *motia*) inflorescence development. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 675-680, 2001.

DZAMIC, A. M. *et al.* Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. **Botanica Serbica**, Belgrade, v. 34, n. 1, p. 57-61, 2010.

EAGLESON J. S.; BOWIE J. Y. Oxfendazole resistance in *Trichostrongylus axei* in cattle in Australia. **Veterinary Record**, Londres, v. 119, n. 24, p. 604, 1986.

EGUALE, T. *et al.* *Haemonchus contortus*: *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 116, n. 4, p. 340-345, 2007.

EGUALE, T.; TADESSE, D.; GIDAY, M. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 137, n. 1, p. 108-113, 2011.

ELSENER, J.; VILLENEUVE, A.; DESCÔTEAUX, L. Evaluation of a strategic deworming program in dairy heifers in Quebec based on the use of moxidectin, an endectocide with a long persistency. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 42, p. 38-44, 2001.

ERLER, F.; ULUG, I.; YALCINKAYA, B. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. **Fitoterapia**, Milano, v. 77, n. 7-8, p. 491-494, 2006.

FALBO, M. K. *et al.* Isolation and characterization of the nematophagous fungus *Arthrobotrys conoides*. **Parasitology Research**, Berlim, v. 112, n. 1, p. 177-85, 2012.

FAO - Food and Agriculture Organization. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 24/01/2013.

FARIAS, M. P. O *et al.* Eficácia *in vitro* do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 68-71, 2007.

FIGUEIRINHA, A. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols. **Journal of Medical Food**, Larchmont, v. 13, n. 3, p. 681-690, 2010.

FRED-JAIYESIMI, A. A.; ADEPOJU, A.; EGBEBUNNI, O. Anthelmintic activities of chloroform and methanol extracts of *Buchholzia coriácea* Engler seed. **Parasitology Research**, Berlim, v. 109, n. 2, p. 441-444, 2011.

FRIEDMAN, M. *et al.* Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6042-6048, 2004.

GANJEWALA, D.; LUTHRA, R. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 5, n. 1, p. 163-172, 2010.

GASBARRE, C. L. *et al.* The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 3-4, p. 281-285, 2009.

GITHIORI, J. B. *et al.* Evaluation of anthelmintic properties of some plants used as livestock dewormers against *Haemonchus contortus* infections in sheep. **Parasitology**, Londres, v. 129, parte 2, p. 245-253, 2004.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plant in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

GENNARI, S. M. *et al.* Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 38, p. 163-172, 1991.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, Jena, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.

GRISI, L. *et al.* Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GRONVOLD, J. *et al.* Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 48, n. 1-4, p. 311-325, 1993.

GROOS, S. J.; RYAN, W. G.; PLOEGER, H. W. Anthelmintic treatment of dairy cows and its effect on milk production. **Veterinary Record**, Londres, v. 144, n. 21, p. 581-587, 1999.

GULLUCE, M. *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, n. 4, p. 1449-1456, 2007.

HENNESSY, D. R. The disposition of antiparasitic drugs in relation to the development of resistance by parasites of livestock. **Acta Tropica**, Basel, v. 56, n. 2-3, p. 79-84, 1994.

HENNESSY, D. R. Physiology, pharmacology, and parasitology. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 145-152, 1997.

HENNESSY, D. R. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, n. 3-4, p. 367-390, 1997.

HERD, R. Impactos Ambientais Associados aos Compostos Endectocidas. In: Padinha, T. **Controle de Nematódeos Gastrointestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco. EMBRAPA-CNGL, 1996. 258p.

HIERRO, I.; VALERO, A.; NAVARRO, M. C. *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L<sub>3</sub> larvae of *Anisakis simplex* s.l. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 13, n. 7, p. 527-531, 2006.

HÖFLING, J. F. *et al.* Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 1065-1068, 2010.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, Londres, v. 130, n. 20, p. 442-446, 1992.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 23/12/2012.

ITHARAT, A. *et al.* *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 90, n. 1, p. 33-38, 2004.

JOBIM, M. B.; SANTURIO, J. M.; RUE, M. L. *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematódeos de bovinos a campo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2256-2263, 2008.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, n. 2, p. 451-458, 2007.

KANG, R. *et al.* Antimicrobial activity of the volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 11, p. 2328-2330, 1992.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 477- 481, 2004.

KARR, L. L.; COATS, J. R. Insecticidal properties of *d*-limonene. **Journal of Pesticide Science**, v. 13, n. 2, p. 287-290, 1988.

KAUFMANN, A. *et al.* Quantification of anthelmintic drug residues in Milk and muscle tissues by liquid chromatography coupled to Orbitrap and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 991-1000, 2011.

KATIKI, L. M. *et al.* Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 1-2, p. 103-108, 2011.

KETOH, G. K.; KOUMAGLO, H. K.; GLITHO, I. A. Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (Poaceae), and the wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 363-371, 2005.

KETOH, G. K. *et al.* Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. **Fitoterapia**, Milano, v. 77, n. 7-8, p. 506-510, 2006.

KHADHRI, A. *et al.* Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. **LWT – Food Science and Technology**, Londres, v. 43, n. 2, p. 331-336, 2010.

KHADHRI, A.; MOKNI, R. E. I.; ARAÚJO, M. E. M. Screening of the antimicrobial properties of the essential oils of *Cymbopogon schoenanthus*. **Tropical Journal of Medicinal Research**, Nnewi, v. 15, n. 2, p. 32-34, 2011.

KHADRI, A. *et al.* Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and  $^{13}\text{C}$  NMR. **Food Chemistry**, Barking, v. 109, n. 3, p. 630-637, 2008.

KIM, J. M. *et al.* Antibacterial activity of carvacol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 6, p. 1364-1368, 1995.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 336-345, 2001.

KUMAR, R.; SRIVASTAVA, M.; DUBEY, N. K. Evaluation of *Cymbopogon martinii* oil extract for control of postharvest insect deterioration in cereals and legumes. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70, n. 1, p. 172-178, 2007.

KUMAR, P. *et al.* Repellent, larvicidal and pupicidal properties of essential oils and their formulations against the housefly, *Musca domestica*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 302-310, 2011.

KUMAR, S.; WAHAB, N.; WARIKOO, R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Pequim, v. 1, n. 2, p. 85-88, 2011.

KUMAR, P. *et al.* Insecticidal evaluation of essential oils of *Citrus sinensis* L. (Myrtales: Myrtaceae) against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 5, p. 1929-1936, 2012.

KUMARAN, A. M. *et al.* Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 17, n. 8, p. 957, 2003.

LANGE, B.; CROTEAU, R. Genetic engineering of essential oil production in mint. **Current Opinion in Plant Biology**, Londres, v. 2, n. 2, p. 139-144, 1999.

LIMA, I. O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIMA, W. S. L. Fatores que interferem no controle das helmintoses de bovinos. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008.

LOUVANDINI, H. *et al.* Phosphorus kinetics in calves experimentally submitted to a trickle infection with *Cooperia punctata*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, n. 1-2, p. 47-51, 2009.

LYNDAL-MURPHY, M. *et al.* Reduced efficacy of macrocyclic lactone treatments in controlling gastrointestinal nematode infections of weaner dairy calves in subtropical eastern Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 168, n. 1-2, p. 146-150, 2010.

MACEDO, I. T. F. *et al.* Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009.

MACEDO, I. T. F. *et al.* Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 1-2, p. 93-98, 2010.

MACEDO, I. T. F. *et al.* *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, n. 3-4, p. 504-509, 2012.

MACHADO, M. *et al.* Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 130, n. 3, p. 223-231, 2012.

MACIEL, M. V. *et al.* Chemical composition of *Eucalyptus spp.* essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 1-7, 2010.

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 2, p. 325-327, 2008.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 24/01/2013.



MARIE-MAGDELEINE, C. *et al.* *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 161, p. 99-105, 2009.

MARTIN, P. J.; LE JAMBRE, L. F.; CLAXTON, J. H. The impact of refugia on the development of thiabendazole resistance in *Haemonchus contortus*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 35-41, 1981.

MARUYAMA, N. *et al.* Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 31, n. 8, p. 1501-1506, 2008.

MELLO, M. H. A. *et al.* Resistência lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 8-12, 2006.

MENDONÇA, F. A. C. *et al.* Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 76, n. 7-8 p. 629-636, 2005.

MIMICA-DUKIC, N. *et al.*, Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 5, p. 413-419, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria nº 48:** Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. Brasília, 1997. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislconsultarLe>> Acesso em: 06/12/2012.

MIOT, H. L. *et al.* Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and deet 50% as repellent for *Aedes* sp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 253-256, 2004.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1469-1477, 2005.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária. In: CAVALCANTE, A. C. R. *et al.* **Doenças parasitárias de ovinos e caprinos: Epidemiologia e controle**. 1ª Edição. Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 331-366.

MOLENTO, M. B. *et al.* Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1139-1145, 2004.

MOLENTO, M. B. *et al.* Bezerras de corte infectadas naturalmente com parasitas gastrintestinais – epidemiologia e tratamento seletivo. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 45-50, 2005.

MOLENTO, M. B. *et al.* Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 1-2, p. 126-132, 2011.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Nematode control and the possible development of anthelmintic resistance. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 75-86, 1999.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 117-121, 2001.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p.892-896, 2005.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.

MOREY, R. A.; KHANDAGLE, A. J. Bioefficacy of essential oils of medicinal plants against housefly, *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, Berlim, v. 111, n. 4, p. 1799-1805, 2012.

NOGUEIRA, F. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. **Parasitology Research**, Berlim, v. 111, n. 1, p. 325-330, 2012.

NOLKEMPER, S. *et al.* Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 72, n. 15, p. 1378-1382, 2006.

NOVELINO, A. M. S.; DAEMON, E.; SOARES, G. L. G. Avaliação da atividade repelente do timol, mentol, salicilato de metila e ácido salicílico sobre larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 700-704, 2007.

OUMZIL, H. *et al.* Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 16, n. 8, p. 727-731, 2002.

PAPACHRISTOS, D. P.; STAMAPOULOS, D. C. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 117-128, 2002.

PARANAGAMA, P. A. *et al.* Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 86-90, 2003.

PAVELA, R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, n. 7-8, p. 691-696, 2005.

PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). **Phytotherapy Research**, Londres, v. 22, n. 2, p. 274-278, 2008.

PEIXOTO, I. T. A. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes acesso de *Mentha* spp. contra *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. 2010. 126 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PEREIRA, M. C. *et al.* Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PESSOA, L. M. *et al.* Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 109, n. 1-2, p. 59-63, 2002.

PIEDRAFITA, D. P. *et al.* Field vaccination of sheep with larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, confers significant protection against na experimental challenge infection. **Vaccine**, Netherlands, v. 30, n. 50, p. 7199-7204, 2012.

PINHEIRO, A. C.; ECHEVARRIA, F. A. M. Susceptibilidade de *Haemonchus* spp. em bovinos ao tratamento anti-helmíntico com albendazole e oxfendazole. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1-2, p. 19-21, 1990.

PRASAD, C. S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martinii* and *Chenopodium ambrsioides* and their synergism against dermatophytes. **Mycoses**, Berlim, v. 53, n. 2, p. 123-129, 2009.

PRASHAR, A. *et al.* Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 63, n. 5, p. 569-575, 2003.

PRICHARD, R. K. *et al.* The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 5, p. 239-250, 1980.

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 54, n. 1-3, p. 259-268, 1994.

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 515-523, 1990.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 445-453, 2001.

QIU, J. *et al.* Menthol diminishes *Staphylococcus aureus* virulence-associated extracellular proteins expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 90, n. 2, p. 705-712, 2011.

RANGEL, V. B. **Avaliação de derivados de lactonas macrocíclicas contra infestações naturais de Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae), Dermatobia hominis (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera:Cuterebridae) e de helmintos gastrintestinais, em bovinos de corte.** 54f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2003.

RANGEL, V. B. *et al.* Resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. às avermectinas em bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p. 186-190. 2005.

ROBERTS, F. H. S. O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Research**, Victoria, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.

ROCA-PÉREZ, L. *et al.* Seasonal cardenolide production and Dop5betar gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, Londres, v. 65, n. 13, p. 1869-1878, 2004.

RÜBENSAM, G. *et al.* Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. **Food Control**, Vurrey, v. 29, n. 1, p. 55-60, 2013.

SANTOS, T. R. *et al.* Helminth fauna of bovines from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 4, p. 934-938, 2010.

SARGISON, N.; WILSON, D.; SCOTT, P. Relative inefficacy of pour-on macrocyclic lactone anthelmintic treatments against *Cooperia* species in Highland calves. **Veterinary Record**, Londres, v. 164, n. 19, p. 603-604, 2009

SCHUCK, V. J. A. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 45-49, 2001.

SCHUHMACHER, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex vírus type 1 and type 2 *in vitro*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, n. 6, p. 504-510, 2003.

SILVA, M. R. *et al.* Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlim, v. 381, n. 5, p. 415-426, 2010.

SINGH, A. K. *et al.* Fungitoxic activity of some essential oils. **Economic Botany**, Nova Iorque, v. 34, n. 2, p. 186-190, 1980.

SINGH, B. R. *et al.* Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin. **International Research of Pharmacy and Pharmacology**, Sapele, v. 1, n. 9, p. 228-236, 2011.

SMITH, G. *et al.* Anthelmintic resistance revisited: under-dosing, chemoprophylactic strategies, and mating probabilities. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 77-91, 1999.

SIVROPOULOU, A. *et al.* Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 45, p. 3197-3201, 1997.

SODER, K. J.; HOLDEN, L. A. Use of nematode-trapping fungi as a biological control in grazing livestock. **The Professional Animal Scientist**, v. 21, n. 1, p. 30-37, 2005.

SÖKMEN, M. *et al.* *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 11, p. 3309-3312, 2004.

SOKOVIC, M. D. Antifungal activity of the essential of *Mentha piperita*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 44, n. 7, p. 511-515, 2006.

SOKOVIC, M. D. *et al.* Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 1, p. 238-249, 2009.

SOUTELLO, R. G. V.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 360-364, 2007.

SOUZA, A. P. *et al.* Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1363-1367, 2008

SOUZA, M.M.C. **Avaliação da atividade ovicida de *Annona squamosa* Linnaeus sobre o nematóide *Haemonchus contortus* Rudolphi e toxicidade em camundongos**. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2003.

STROMBERG *et al.* Production responses following strategic parasite control in a beef cow/calf herd. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 68, n. 4, p. 315-322, 1997.

STROMBERG, B. E. *et al.* *Cooperia punctata*: Effect on cattle productivity? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 284-291, 2012.

SUAREZ, V. H.; BEDOTTI, D. O. Effects of na integrated control programme with ivermectin on growth, carcass composition and nematode infection of beef cattle in Argentina's western pampas. **Research in Veterinary Science**, London, v. 50, n. 2, p. 195-199, 1991.

SUAREZ, V. H.; CRISTEL, S. L. Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 111-117, 2007.

TALBERT, R.; WALL, R. Toxicity of essential and non-essential oils against the chewing louse, *Bovicola (Werneckiella) ocellatus*. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 831-835, 2012.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3ª edição. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. 2010. 742p.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 183-194, 2002.

TCHOUMBOUGNANG, F. *et al.* *In vivo* antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 71, n. 1, p. 20-23, 2005.

TRABOULSI, A. *et al.* Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 58, n. 5, p. 491-495, 2002.

TROMBETTA, D. *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2472-2478, 2005.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 205-210, 2010.

USDA - United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 24/01/2013.

VAN WYK, J. A.; VAN SCHALKWYK, P. C. A novel approach to the control of anthelmintic resistant *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 35, n. 1-2, p. 61-69, 1990.

VAN WYK, J. A. Refugia – overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 68, n. 1, p. 55-67, 2001.

VON SAMSOM-HIMMELSTJERNA, G. *et al.* Standardization of the egg hatch test for detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. **Parasitology Research**, Berlim, v. 105, n. 3, p. 825-834, 2009.

WAGHORN, T. S. *et al.* Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 54, n. 6, p. 278-282, 2006.

WANG, J.; WANG, R.; YANG, X. Y. Efficacy of na *Arthrobotrys oligospora* N mutant in nematode trapping larvae after passage through the digestive tract of sheep. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 161, n. 3-4, p. 359-361, 2013.

WILSON, C. L. *et al.* Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinérea*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 2, p. 204-210.

XU, M. *et al.* Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 327-335.

YANG, P.; MA, Y. Repellent effect of plant essential oils against *Aedes albopictus*. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 30, n. 2, p. 231-234, 2005.

ZUZARTE, M. *et al.* *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, n. 3, p. 1505-1510, 2012.



### 3 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus staigeriana* SOBRE ESTÁGIOS PRÉ-ADULTOS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS

#### RESUMO

Os nematódeos gastrintestinais causam problemas na saúde animal. O controle desses nematódeos é realizado por drogas anti-helmínticas as quais seu intenso uso resulta no surgimento da resistência parasitária. Essa resistência é reconhecida mundialmente. No Brasil, *Cooperia sp.* e *Haemonchus sp.* são os principais parasitas. Extratos de plantas têm sido estudados para reduzir o impacto do parasitismo. O estudo avaliou a atividade de *Eucalyptus staigeriana* em nematódeos de bovinos pelo teste de eclodibilidade de ovos (TEO) e o teste de migração de larvas em ágar (TMLA). Ovos de nematódeos foram adicionados em placas de 24 poços com concentrações de 0,04 a 5,62 mg/mL em seis repetições e incubados por 24 horas. A leitura do TEO foi realizada em microscópio invertido. Para o TMLA, larvas de *Cooperia sp.* foram adicionadas em placas de 24 poços com concentrações de 0,70 a 45 mg/mL em seis repetições e incubados por 6 horas. Posteriormente, as placas receberam 1 mL de ágar em cada poço e toda a solução foi transferida para aparatos e incubadas por 18 horas. Os aparatos foram retirados da incubação e a água foi transferida para tubos, onde foram centrifugados e a leitura feita em microscópio invertido. O *E. staigeriana* obteve uma DL50 de 1,04 mg/mL no TEO e não apresentou efeito anti-helmíntico no TMLA. Pela cromatografia gasosa, o limoneno, geranial e o neral foram os principais compostos identificados. No teste de citotoxicidade o extrato apresentou fraca atividade. O óleo de *E. staigeriana* obteve um resultado promissor e pode ser um candidato contra nematódeos gastrintestinais de bovinos, porém testes de toxicidade em cobaias e de eficácia *in vivo* devem ser realizados.

Palavras-chave: gado, parasita, planta, doença, anti-helmíntico

## EFFECT OF *Eucalyptus staigeriana* ESSENTIAL OIL ON YOUNG STAGES OF GASTROINTESTINAL NEMATODES OF CATTLE.

### ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes cause problems in animal health. The control of these nematodes is made by anthelmintic drugs which their intensive use causes the problem of parasitic resistance. This resistance is recognized worldwide. In Brazil, *Cooperia* sp. and *Haemonchus* sp. are the main species of cattle. Plant extracts have been studied to reduce the impact of parasitism. Our study aimed to test the *in vitro* activity of *Eucalyptus staigeriana* on nematodes of cattle using egg hatch test (EHT) and larval migration in agar test (LMAT). Eggs from nematodes were added in 24 wells plates with concentrations from 0.04 to 5.62 mg/ml in six replicates and incubated for 24 hours. The reading was made under an inverted microscope. For the LMAT, *Cooperia* sp. larvae were added in 24 wells plates with concentrations from 0.70 to 45 mg/ml in six replicates and incubated for 6 hours. Afterwards the plates received 1 ml of gelled agar in each well and all solution was transferred to apparatuses previously prepared and incubated for 18 hours. These apparatuses were taken out from incubation and the water was transferred to tubes that were centrifuged and read under inverted microscope. *E. staigeriana* obtained an LC<sub>50</sub> of 1.04 mg/ml on EHT and non-anthelmintic effect on LMAT. The chromatography revealed that limonene, geranial and neral were the main compounds identified. Cell toxicity revealed that the extract did not have activity. *E. staigeriana* obtained promising result and may be a candidate against gastrointestinal nematodes of cattle. Toxicological test in rats/mice and *in vivo* tests must be performed to conclude the anthelmintic effect.

Keywords: livestock, parasite, plant, disease, anthelmintic

### 3.1 INTRODUÇÃO

Nematódeos gastrintestinais são responsáveis por problemas para a saúde animal diminuindo a produtividade dos bovinos no mundo. Atualmente, o controle desses nematódeos é feito com o uso de drogas anti-helmínticas. Porém, seu uso de forma irresponsável como, por exemplo, objetivando economia de dinheiro, torna crescente a ameaça do aparecimento da resistência parasitária. Além disso, certa quantidade residual de anti-helmíntico pode ser carregada pelas fezes causando contaminação no ambiente (HAMMOND; FIELDING; BISHOP, 1997).

O problema da resistência anti-helmíntica foi reconhecido primeiramente em parasitas de ovinos e caprinos (WALLER, 1997). Antes de 2004, existiam poucos relatos de resistência em nematódeos de bovinos (KAPLAN, 2004; LIFSCHITZ *et al.*, 2010), porém atualmente esse problema foi descrito na Nova Zelândia, Alemanha, Bélgica e Suécia em *Ostertagia sp.* (WAGHORN *et al.*, 2006; DEMELER *et al.*, 2009), na Argentina, Estados Unidos e Austrália em *Cooperia sp.* e *Haemonchus sp.* (ANZIANI *et al.*, 2004; FIEL *et al.*, 2001; SUAREZ; CRISTEL, 2007; GASBARRE *et al.*, 2009; LYNDAL-MURPHY *et al.*, 2010), na Escócia em *Cooperia sp.* (SARGISON; WILSON; SCOTT, 2009), na Algeria em *Trichostrongylus sp.* (BENTOUNSI; KHAZNADAR; CABARET, 2012) e no México em *Ostertagia sp.*, *Haemonchus sp.*, *Cooperia sp.* e *Trichostrongylus sp.* (CANUL-KU *et al.*, 2012) causando um importante impacto na bovinocultura e mostrando a importância no controle desses parasitas (STROMBERG *et al.*, 2012).

No Brasil, a resistência tem sido relatada nos estados do sudeste (SOUTELLO; SENO; AMARANTE, 2007; CARDOSO *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2011), centro-oeste (BORGES *et al.*, 2008) e sul (SOUZA *et al.*, 2008; CEZAR *et al.*, 2010) mostrando *Cooperia* e *Haemonchus* como os principais parasitas.

A procura por novas alternativas de controle dos parasitos é constante para diminuir o impacto negativo dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes. Atualmente se faz o uso de raças resistentes (BRICARELLO *et al.*, 2007), controle com fungos nematófagos (GRONVOLD *et al.*, 1993; SODER *et al.*, 2005) e extratos vegetais (BIZIMENYERA *et al.*, 2006).

Os extratos de plantas vêm sendo estudados como nova alternativa contra nematódeos gastrintestinais e representam uma inovação para o desenvolvimento

de novas drogas (ANTHONY; FYFE; SMITH, 2005). Estudos recentes têm relatado plantas com propriedades anti-helmínticas (WALLER *et al.*, 2001; GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006). Além disso, extratos vegetais são ambientalmente aceitos por sua biodegradabilidade (HAMMOND; FIELDING; BISHOP, 1997).

Nos países em desenvolvimento, plantas e seus produtos são usados para tratar casos de parasitismo (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006) e pesquisas com plantas em nematódeos de ovinos e caprinos estão em crescimento (MONTEIRO *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2012), porém, em bovinos existem poucos relatos (FRED-JAIYESIMI; ADEPOJU; EGBEBUNNI, 2011; NOVOBILSKY; MUELLER-HARVEY; THAMSBORG, 2011).

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae sendo planta nativa da Austrália, tem sido cultivado para a indústria farmacêutica e cosmética (HASEGAWA *et al.*, 2008). Estudos relatam que algumas espécies de eucalipto têm atividade antimicrobiana (DELAQUIS *et al.*, 2002), repelente (ERLER; ULUG; YALCINKAYA, 2006), antifúngica (RAMEZANI *et al.*, 2002), analgésica e anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2003). A espécie *Eucalyptus staigeriana* demonstrou eficácia contra o mosquito *Lutzomyia longipalpis* (MACIEL *et al.*, 2010); as pragas de feijão *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (BRITO *et al.*, 2006); o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CHAGAS *et al.*, 2002), bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* (WILKINSON; CAVANAGH, 2005) e o parasito *Haemonchus contortus* (MACEDO *et al.*, 2010).

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade *in vitro* de *Eucalyptus staigeriana* em nematódeos de bovinos.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.1 Nematódeos de bovinos

Larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) de *Cooperia* oriundas do estado do Mato Grosso do Sul, foram obtidas de coproculturas (ROBERTS; O'SULLIVAN, 1950) e

usadas para infecção artificial (4.000 larvas) de um bezerro da raça Holandesa de seis meses de idade e mantido no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Após aproximadamente 3 semanas, foi possível obter a quantidade de aproximadamente 1.000 ovos por grama de fezes para a realização do teste de eclodibilidade de ovos (TEO) (COLES *et al.*, 1992) bem como novas coproculturas para o teste de migração de larvas em ágar (TMLA) (MOLENTO; PRICHARD, 2001).

### 3.2.2 Óleo essencial

O óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* foi comercialmente obtido (WNF Ltda) e testado no TEO e no TMLA em diferentes concentrações com o solvente Tween 80 para obter uma melhor emulsão em água. Para os controles positivos, o solvente usado foi o dimetilsulfóxido (DMSO). Uma emulsão estável do óleo essencial com Tween 80 e água foi feita por agitação em vórtex bem como para o controle positivo com anti-helmíntico e DMSO.

### 3.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS)

Esse procedimento foi realizado na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas.

Um volume de 15 mg do óleo essencial foi dissolvido em 1 mL de acetato de etila e injetado no equipamento de CG/MS Agilent HP 6890, equipado com detector de massas modelo HP 5975 e coluna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A CG/MS foi operada usando injeção no modo split com as seguintes temperaturas: injetor a 220°C e coluna a 60°C com temperatura crescente de 3°C/minuto e temperatura final de 240°C. O detector de massas foi selecionado a 250°C. O hélio foi usado como gás de arraste a 1 mL/minuto e o impacto eletrônico foi selecionado a 70 elétron volts (eV). Os índices de retenção (IR) do óleo essencial foram determinados por injeção de hidrocarbonetos padrões sob as mesmas condições. A

identificação dos compostos foi realizada por comparação com um banco de dados da literatura (ADAMS, 2007) e do próprio software de análise.

#### 3.2.4 Testes *in vitro*

##### 3.2.4.1 Recuperação de ovos

Esse processo foi realizado de acordo com Bizimenyera *et al.* (2006) após algumas modificações em que fezes da ampola retal de um bezerro foram misturadas com água a 37°C e filtrada por peneiras de 250, 150, 75 e 25 µm. Os ovos que ficaram retidos na última peneira foram recuperados por água destilada, transferidos para tubos de ensaio e centrifugados a 3.000 rpm por 3 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e uma solução saturada de NaCl foi adicionada aos tubos para uma nova centrifugação. O sobrenadante foi despejado em peneira de 25 µm e a mesma foi lavada com água destilada. O conteúdo foi transferido para um Béquer para utilização no teste de eclodibilidade de ovos.

##### 3.2.4.2 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)

Ovos de nematódeos gastritestinais foram inseridos em placas de 24 poços (aproximadamente 100 ovos/poço) onde estas continham seis repetições para cada concentração (0,04; 0,08; 0,17; 0,35; 0,70; 1,40; 2,81 e 5,62 mg/mL) do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*. As placas foram incubadas por 24 horas a 27°C e, posteriormente, foram lidas em microscópio invertido para calcular a porcentagem de eclodibilidade em cada poço pela seguinte fórmula: Eclodibilidade (%) =  $L_1 / (\text{ovos} + L_1) \times 100$ , onde  $L_1$  corresponde às larvas de primeiro estágio.

### 3.2.4.3 Teste de migração de larvas em ágar (TMLA)

Esse teste foi primeiramente descrito por D'Assonville, Janovsky e Verster (1996) e modificado por Molento e Prichard (2001) o qual recebeu algumas modificações descritas a seguir.

Para esse teste, aparatos foram confeccionados com uma placa de *Petri* preenchida com 20 mL de água destilada, duas malhas plásticas de diferentes aberturas (1 mm e 0,5 mm) na base e um cilindro de PVC acima das malhas. Esses aparatos foram levados ao freezer para congelamento (Figura 1).

Larvas  $L_3$  foram desembainhadas usando 0,3% de hipoclorito de sódio durante uma hora. Posteriormente, as larvas foram lavadas três vezes por centrifugação com água destilada e após quantificação, foram adicionadas em placas de 24 poços (aproximadamente 200 larvas/poço). As concentrações testadas foram 0,70; 1,40; 2,81; 5,62; 11,25; 22,50 e 45 mg/mL. Para cada concentração, foram utilizadas seis repetições. Após seis horas de incubação a 27°C, 1 mL de ágar a 1,4% foi adicionado em cada poço e toda a solução contendo ágar, larvas, água e óleo essencial foi transferida para o aparato previamente preparado. Esses aparatos foram incubados a 27°C acima com um foco de luz de 150 MHz para estimular a motilidade larvar da solução de ágar para a água. Após 18 horas, essa água foi transferida para tubos de 50 mL onde foram centrifugados a 3.000 rpm durante dois minutos. Uma alíquota de 2 mL foi transferida do decantado de cada tubo para poços de uma placa de 24 poços. A leitura do teste foi feita em microscópio invertido realizando a contagem de  $L_3$ . A média da quantidade de larvas migradas em cada concentração foi transformada em porcentagem de migração pelo programa GraphPad Prism® 5 para Windows. O controle positivo foi feito por moxidectina e o negativo por água destilada e Tween 80

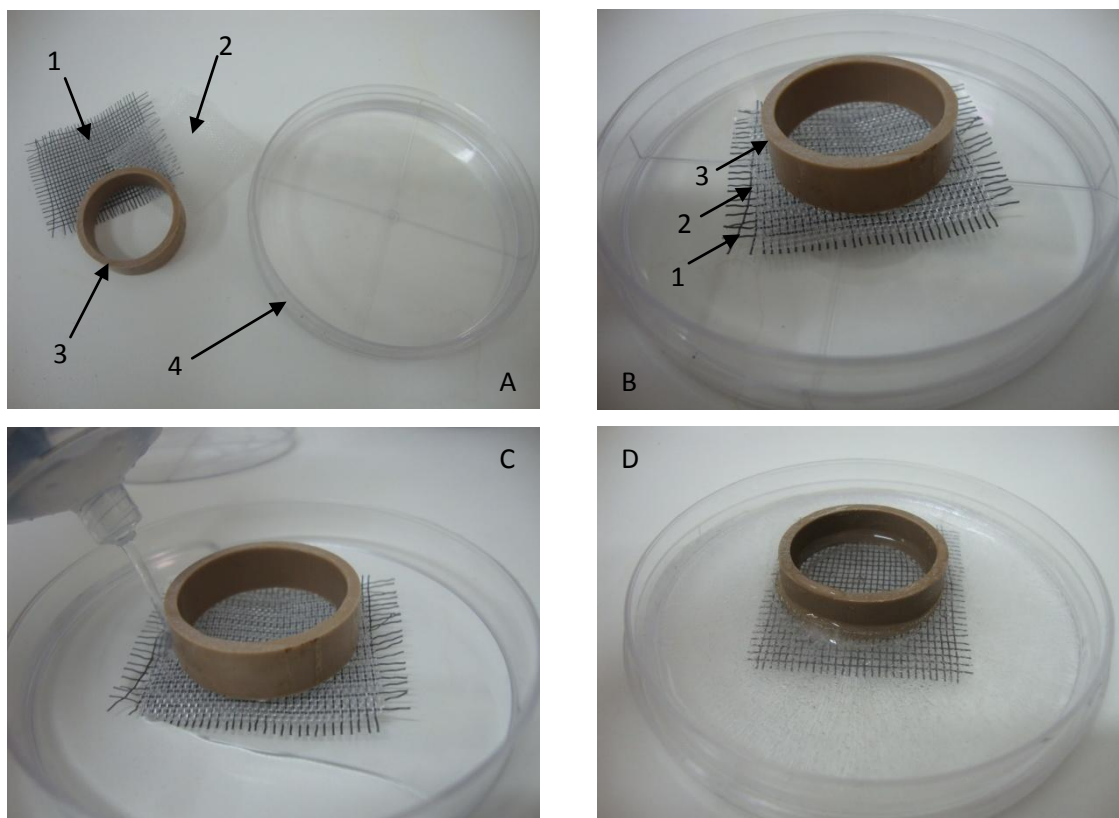


Figura 2 – Aparato utilizado para o teste de migração de larvas em ágar. A = material utilizado; B = montagem do aparato; C = adição de água destilada; D = aparato após congelamento.

Legenda: 1 = malha de 1 mm; 2 = malha de 0,5 mm; 3 = anel de PVC; 4 = placa de *Petri*.

FONTE: O autor (2013)

#### 3.2.4.4 Teste de toxicidade em células

Nessa metodologia, a porcentagem de crescimento é avaliada pela espectrofotometria da absorbância das proteínas celulares coradas com sulforrodamina B (SRB). Essa metodologia analisa se uma substância interrompe o crescimento celular sem provocar morte da célula (citostática) ou ocorrendo morte celular (citocida) (SHOEMAKER, 2006).

O protocolo utilizado foi o descrito por Monks *et al.* (1991). O óleo essencial foi avaliado quanto a sua atividade antiproliferativa em células tumorais humanas pelo teste da SRB para análise do crescimento celular.

Essa etapa do projeto foi feita em colaboração com a Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas,



Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas. Oito linhagens celulares cedidas pelo *Frederick Cancer Research & Development Center, National Cancer Institute* (NCI, EUA) foram usadas no estudo. As linhagens celulares foram U251 (glioma), MCF-7 (adenocarcinoma mamário), 786-0 (adenocarcinoma renal), PC-3 (adenocarcinoma prostático), OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovário), HT29 (adenocarcinoma coloretal), K562 (eritroleucêmica) e HaCat (queratinócito humano, célula normal). Essas células, mantidas em meio RPMI/SFB com estreptomicina, foram inseridas em placas de 96 poços (100 µL) e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. A amostra foi fracionada em 0,25; 2,5; 25; e 250 µg/mL com auxílio do DMSO para diluição. Para o controle positivo, foi utilizada a doxorrubicina nas mesmas concentrações. Após incubação por 48 horas a 37°C as células foram fixadas com ácido tricloroacético, incubadas a 4°C por uma hora e lavadas em água corrente. Após secagem à temperatura ambiente, as placas foram coradas com SRB 0,4% (50 µL) dissolvida em ácido acético 1%. Posteriormente, as placas foram lavadas com ácido acético 1% e submetidas novamente à temperatura ambiente para secagem. A adição de Trizma Base foi realizada para a ressuspensão do corante ligado às proteínas celulares. A leitura foi feita por espectrofotometria da absorbância em 540 nm em leitor de microplacas.

### 3.2.5 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey e construção de curva dose-resposta pelo programa GraphPad Prism® 5.

Para o teste de toxicidade, gráficos de porcentagem de crescimento foram gerados para cada linhagem celular por meio do programa Origin 8 para Windows. A interpretação dos resultados foi de acordo com a NCI.

### 3.3 RESULTADOS

O óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* obteve atividade ovicida pelo TEO. A concentração capaz de inibir 50% da eclosão de ovos foi de 1,04 mg/mL (Figura 3). Por outro lado, o óleo essencial não inibiu a motilidade larvar. Houve pouca sensibilidade de ovos e larvas sob os solventes Tween 80 e DMSO como observado na Tabela 2. As coproculturas resultaram na identificação de *Cooperia* sp. (89%) e *Trichostrongylus* sp. (11%) realizadas anteriormente ao TMLA.

No teste de citotoxicidade, o óleo essencial apresentou fraca atividade antiproliferativa contra células tumorais e normais (Tabelas 3 e 4) (Figura 4).

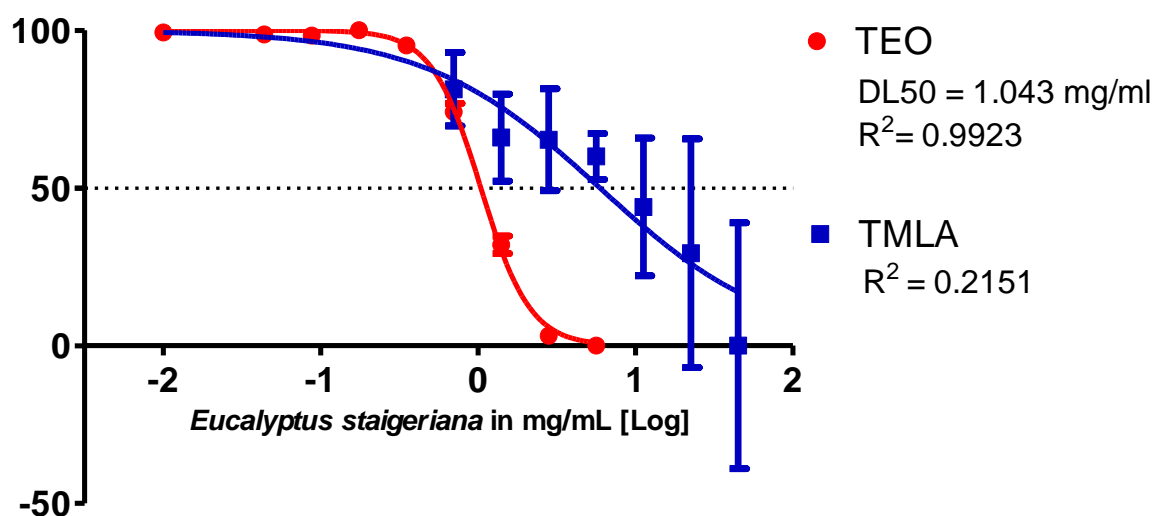


Figura 3 - Curva dose-resposta de *Eucalyptus staigeriana* nos testes de eclodibilidade de ovos (TEO) e migração de larvas em ágar (TMLA).  
FONTE: O autor (2013)

TABELA 2 - RESULTADOS DOS TESTES DE ECLODIBILIDADE DE OVOS (TEO) E MIGRAÇÃO DE LARVAS (TMLA) DE *Eucalyptus staigeriana* EM NEMATÓDEOS DE BOVINOS

Concentração (mg/mL)	TEO (%)	TMLA (Média)
Controle Negativo (Tween 80)	95,45 <sup>a</sup>	205,83 <sup>a</sup>
Controle Negativo (DMSO)	96,07 <sup>a</sup>	208,67 <sup>a</sup>
0,04	94,83 <sup>a</sup>	-
0,08	94,56 <sup>a</sup>	-
0,17	96,11 <sup>a</sup>	-
0,35	91,56 <sup>a</sup>	-
0,70	71,34 <sup>b</sup>	201,17 <sup>a</sup>
1,40	30,85 <sup>c</sup>	197,33 <sup>a</sup>
2,81	3,19 <sup>d</sup>	197,17 <sup>a</sup>
5,62	0,13 <sup>d</sup>	195,83 <sup>a</sup>
11,25	-	191,83 <sup>a</sup>
22,50	-	188,17 <sup>a</sup>
45	-	180,83 <sup>a</sup>
Controle Positivo	0,00 <sup>d</sup> (Albendazol)	9,00 <sup>b</sup> (Moxidectina)

Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,05).

FONTE: O autor (2013)

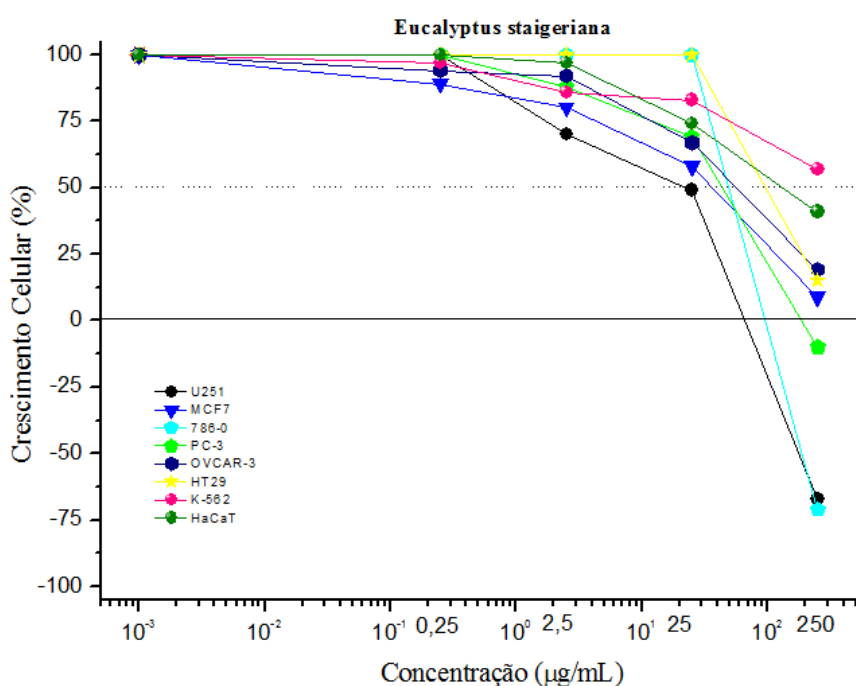


Figura 4 - Resultado do teste de atividade antiproliferativa de *Eucalyptus staigeriana* em células tumorais e normais humanas.

Legenda: U251 = glioma; MCF-7 = mama; 786-0 = rim; PC-3 = próstata; OVCAR-3 = ovário; HT29 = coloretal; K562 = eritroleucêmica; HaCat = queratinócito humano, célula normal.

FONTE: O autor (2013)

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE *Eucalyptus staigeriana* NECESSÁRIA PARA INIBIR 50% DE CRESCIMENTO CELULAR (GI 50 em µg/mL)

Amostra	2	m	7	p	o	h	k	q
Doxorrubicina	0,026	0,28	0,23	1,1	5,7	1,3	2,2	1,4
<i>E. staigeriana</i>	25,0	25,8	38,9	25,0	52,0	212,9	>250	138,7

2 = U251 (glioma, SNC); m = MCF-7 (mama); 7 = 786-0 (rim); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT29 (coloretal); k = K562 (leucemia); q = HaCat (queratinócito humano, célula normal).

FONTE: O autor (2013)

TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO EM LOGARÍTIMO DE *Eucalyptus staigeriana* NECESSÁRIA PARA INIBIR 50% DE CRESCIMENTO CELULAR (Log GI 50)

Amostra	2	m	7	p	o	h	k	q
Doxorrubicina	-1,58	-0,55	-0,63	0,04	0,75	0,11	0,34	0,14
<i>E. staigeriana</i>	1,39	1,41	1,58	1,39	1,71	2,32	2,39	2,14

Inativo: log GI50 > 1,50; Atividade fraca: log GI50 > 1,10; moderada: log GI50 > 0-1,10; forte: log GI50 < 0.

FONTE: O autor (2013)

TABELA 5 - QUANTIDADE DE COMPONENTES ISOLADOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus staigeriana* POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Composto	Quantidade (%)
Limoneno	24,3
Geranial	12,7
Neral	9,3
Alfa-terpinoleno	8,8
Geraniol	5,4
Acetato de geranila	5,9
Metil geraniato	5,7
1,8-cineol	5,1
Alfa-pineno	3,9
Beta-pineno	2,3
Alfa-felandreno	2,5
Nerol	1,9
Gama-terpineno	1,9
p-cimeno	2,5
Acetato de nerila	1,9
Linalol	1,2
4-terpineol	1,3
Alfa-terpineol	1,0
Mirceno	0,7
p-cimen-8-ol	0,6
Tricycleno	0,4

FONTE: O autor (2013)

### 3.4 DISCUSSÃO

Os testes utilizados para avaliação das substâncias inibem o embrionamento e eclodibilidade de ovos de nematódeos e motilidade de estágios pré-adultos de helmintos (D'ASSONVILLE; JANOVSky; VERSTER, 1996; MOLENTO; PRICHARD, 2001; TAYLOR; HUNT; GOODYEAR, 2002). Testes *in vitro* possuem muitas vantagens como, por exemplo, serem simples de executar; baixo custo; rápido retorno do efeito permitindo uma seleção de plantas em larga escala; necessitam de pouca quantidade de material biológico e atingem diferentes estágios parasitários (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006; HOSTE *et al.*, 2008).

No presente estudo, o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* apresentou atividade ovicida com DL50 de 1,04 mg/mL e 99% de eficácia em 5,6 mg/mL. Outros estudos com óleos essenciais encontraram atividade anti-helmíntica em ovos de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes com valores menores, como em *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* e *Mentha piperita* mostrando DL50 de 0,13; 0,04; 0,26 mg/mL respectivamente e DL99 de 0,61; 0,27; 1,0 mg/mL respectivamente (KATIKI *et al.*, 2011), *Croton zehntneri* e *Lippia sidoides* demonstrando LC50 de 0,74 e 0,40 mg/mL respectivamente (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007). Porém, *Eucalyptus globulus* obteve maiores valores comparados ao do presente estudo mostrando DL50 e DL99 de 8,3 e 21,75 mg/mL (MACEDO *et al.*, 2009).

No presente estudo, não houve efeito tóxico do óleo de *Eucalyptus staigeriana* em larvas. Alguns autores determinaram atividade larvicida em seus trabalhos com *C. martinii*, *C. schoenanthus* e *M. piperita* demonstrando DL50 de 0,15; 0,06; 0,26 mg/mL e DL99 de 0,35; 0,27; 0,91 respectivamente (KATIKI *et al.*, 2011) *Eucalyptus globulus* obteve DL50 de 6,92 mg/mL e inibiu 98,7% o desenvolvimento larvar em 43,5 mg/mL (MACEDO *et al.*, 2009). Um estudo com *Eucalyptus staigeriana* em nematódeos de caprinos demonstrou valores de DL50 de 0,324 mg/mL no TEO e 1,702 mg/mL em um teste de desenvolvimento larvar (TDL). A dose que obteve 99% de eficácia foi de 1,35 mg/mL no TEO e 5,4 mg/mL no TDL (MACEDO *et al.*, 2010). Apesar de nossos resultados mostrarem uma DL50 maior no TEO comparado ao estudo citado, foi possível determinar atividade anti-helmíntica do óleo essencial em nematódeos de bovinos. Estudos mais detalhados devem ser empregados para avaliar possíveis diferenças de susceptibilidade entre espécies de nematódeos aos extratos vegetais.

Diferenças entre valores podem também ocorrer devido a outras razões: 1. A maneira de colheita do vegetal, a extração e estocagem do óleo. Existe uma grande variação entre protocolos podendo resultar em mudanças na composição do material vegetal e seu efeito anti-helmíntico. 2. As variações no clima e no ambiente causam impacto nos componentes da planta afetando suas propriedades químicas e físicas (MUELLER-HARVEY; MCALLAN, 1992; ATHANASIADOU; GITHIORI; KYRIAZAKIS, 2007). 3. A variabilidade genética pode modificar a composição do vegetal (CROOM, 1983). 4. O tipo de teste usado. O teste de desenvolvimento larvar (HUBERT; KERBOEUF, 1992) avalia a evolução de larvas L<sub>1</sub> para L<sub>3</sub>. O estudo

realizado por Macedo *et al.* (2010) usando o TDL mostrou uma curva dose-resposta de *E. staigeriana* com DL50 de 1,702 mg/mL e DL99 de 5,4 mg/mL. Talvez seja efetivo em estágios L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>, porém não em L<sub>3</sub>. O efeito larvicida poderia ter ocorrido devido à inibição da alimentação larvar ou motilidade. Sugere-se então a realização do teste de inibição da alimentação larvar (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2005) para concluir se o óleo essencial possui inibição na motilidade ou na alimentação larvar.

5. Deve-se considerar também a época do ano que em a planta foi coletada, pois a qualidade e quantidade de compostos ativos variam ao longo do ano como visto em um estudo com *Digitalis obscura*. As folhas da espécie apresentaram concentrações de cardenolídeos muito baixas no período da primavera com um brusco aumento no verão e novamente um decréscimo no outono (ROCA-PÉREZ *et al.*, 2004; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A identificação dos compostos de plantas é importante para o desenvolvimento de novas drogas devido à vasta flora mundial (KARAMAJ; RAHUMAN, 2010). O objetivo é a extração dos componentes bioativos de plantas e testar seu efeito anti-helmíntico por testes *in vitro* e *in vivo* (ATHANASIADOU; GITHIORI; KYRIAZAKIS, 2007). O CG/MS quantifica e separa os compostos dos óleos essenciais e é o método de escolha para óleos voláteis devido sua alta eficiência e uso simples (SIMÕES; SPITZER, 1999). As principais substâncias encontradas foram o limoneno, geranial e neral como descritas na Tabela 5.

Estudos com óleos essenciais possuindo altas concentrações de limoneno têm relatado eficácia em *Actinomyces naeslundii* (KANG *et al.*, 1992), *Rhyzopertha Dominica*, *Tribolium castaneum* (PRATES *et al.*, 1998) e *Musca domestica* (KUMAR *et al.*, 2012). Geranial e neral são isômeros presentes em plantas onde a mistura desses dois compostos é conhecida como citral (WOHLMUTH *et al.*, 2006) Citral possuiu efeito em estudos com *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (FRIEDMAN *et al.*, 2004), *Trypanosoma cruzi* (CARDOSO; SOARES, 2012), *Tetranychus urticae* (LIM *et al.*, 2011) e *Leishmania sp.* (MACHADO *et al.*, 2012).

Abdelgarder, Qarallah e Al-ramamneh (2012) estudaram o efeito do óleo essencial de frutas cítricas com 96% de limoneno contra *Ascaridia galli*. O resultado foi a redução de 68,4% da carga parasitária de frangos artificialmente infectados.

Hierro, Valero e Navarro (2006) testaram o citral contra larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* obtendo 85,9% de redução parasitária em peixes.

Os estudos anteriormente citados sugerem o limoneno e o citral como responsáveis pelo efeito anti-helmíntico. Dessa forma, é necessário testar esses dois compostos isoladamente para confirmar essa atividade.

Estudos com limoneno demonstraram efeito antitumoral em alguns tipos de câncer (HAAG; LINDSTROM; GOULD, 1992; UEDO *et al.*, 1999). Nesses trabalhos os autores relataram que houve apoptose e inibição do desenvolvimento tumoral. Os resultados de Uedo *et al.* (1999) indicaram que o limoneno reduziu a síntese de DNA inibindo assim o ciclo celular. Dessa forma, sugere-se que o limoneno possa inibir o crescimento e diferenciação celular e consequentemente a embriogênese de ovos de helmintos.

Estudos com efeitos do citral serão abordados no último capítulo.

Testes *in vitro* estão sendo frequentemente usados para selecionar extratos de plantas sem uma experimentação *in vivo* simultânea. Embora os testes *in vitro* ofereçam uma análise de um grande número de extratos com atividade anti-helmíntica, isso não é sempre observado em ensaios *in vivo* e, portanto a relevância dos testes *in vitro* para *in vivo* é questionável (ATHANASIADOU; KYRIAZAKIS, 2004). Um exemplo foi demonstrado em um estudo com *Cymbopogon schoenanthus* em um ovino artificialmente infectado (KATIKI *et al.*, 2011). Os autores observaram um efeito anti-helmíntico no TDL em larvas de *Haemonchus contortus*, porém houve falha no ensaio *in vivo*. As concentrações de 180 e 360 mg/kg não foram suficientes para reduzir a carga parasitária.

Assim, para provar que o óleo *Eucalyptus staigeriana* possa ser usado como anti-helmíntico, o teste *in vivo* deve ser realizado, mas possíveis efeitos tóxicos em animais devem ser considerados (WALLER *et al.*, 2001). Testes toxicológicos são necessários para determinar os efeitos e a margem de segurança dos óleos essenciais em organismos vivos (MACEDO *et al.*, 2009).

O óleo de *E. staigeriana* apresentou fraca atividade quando comparado à doxorrubicina, sugerindo uma ausência de sinergismo entre os compostos do óleo essencial. As células do tipo não tumoral (HaCat) não foram afetadas pela amostra. Isso pode apontar uma seletividade de ação anti-helmíntica no presente trabalho assim como de outros efeitos biológicos com a espécie discutidos anteriormente e mostrando uma possível segurança no uso em mamíferos. Esse método também foi usado no trabalho de Itharat *et al.* (2004) em investigações com plantas para o tratamento do câncer. Os autores presenciaram um efeito promissor de plantas em

células tumorais, entretanto em células normais houve baixa toxicidade. Todavia, métodos *in vivo* de toxicidade em cobaias devem ser realizados bem como testes bioquímicos, pois casos de efeitos tóxicos em órgãos como fígado e rins por fitoterápicos têm sido reportados (BAGNIS *et al.*, 2004; COLSON; DE BROE, 2005; KOSIF *et al.*, 2010).

### 3.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* pode ser um candidato para uso contra nematódeos gastrintestinais de bovinos.



## REFERÊNCIAS

ABDELQADER, A. *et al.* Anthelmintic effects of citrus peels enthanolic extracts against *Ascaridia galli*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 188, n. 1-2, p. 78-84, 2012.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A. *et al.* The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 56-61, 2005.

ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 462–468, 2005.

ANZIANI, O. S. *et al.* Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 303-306, 2004.

ATHANASIADOU, S.; GITHIORI, J.; KYRIAZAKIS, I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. **Animal**, Cambrigde, v. 1, n. 9, p. 1392-1400, 2007.

BAGNIS, C. I. *et al.* Herbs and the kidney. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2004.

BENTOUNSI, B.; KHAZNADAR, A.; CABARET, J. Resistance of *Trichostrongylus* spp. (Nematoda) to benzimidazole in Algerian cattle herds grazed with sheep. **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 2, p. 1021-1023, 2012.

BIZIMENYERA, E. S. *et al.* *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 3-4, p. 336–343, 2006.

- BORGES, F. A. *et al.* Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25% ivermectin + 1.25% abamectin in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, n. 3-4, p. 299-307, 2008.
- BRICARELLO, P. A. *et al.* Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 272-278, 2007.
- BRITO, J. P. *et al.* Efeito de óleos essenciais de *Eucalyptus spp.* Sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boh., 1833) (Coleoptera: Bruchidae) e *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em duas espécies de feijões. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madri, v. 32, n. 4, p. 573-580, 2006.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. *et al.* Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 288-294, 2007.
- CANUL-KU, H. L. *et al.* Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 292-298, 2012.
- CARDOSO, J. M. S. *et al.* Identification of ivermectin and doramectin-resistant *Cooperia punctata* (LINSTOW, 1907) in a dairy herd in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, suplemento, p. 75-81, 2008.
- CARDOSO, J.; SOARES, M. J. *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 8, p. 1026-1032, 2010.
- CEZAR, A. S. *et al.* Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 7, p. 523-528, 2010.
- CHAGAS, A. C. S. *et al.* Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* em *Boophilus microplus*:. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.
- COLES, G. C. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992.

COLSON, R. D.; DE BROE, M. E. Kidney injury from alternative medicines. **Advances in Chronic Kidney Disease**, Philadelphia, v. 12, n. 3, p. 261-275, 2005.

COSTA, M. S. V. L. F. *et al.* Anthelmintic resistance in a dairy cattle farm in the state of Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2011.

CROOM, E. M. Documenting and evaluating herbal remedies. **Economic Botany**, Bronx, v. 37, n. 1, p. 13-27, 1983.

D'ASSONVILLE, J. A.; JANOVSKY, E.; VERSTER, A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 61, n. 1-2, p. 73-80, 1996.

DELAQUIS, P. J. *et al.* Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 1-2, p. 101-109, 2002.

DEMELER, J. *et al.* Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 109-115, 2009.

ERLER, F.; ULUG, I.; YALCINKAYA, B. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. **Fitoterapia**, Milano, v. 77, n. 7-8, p. 491-494, 2006.

FIEL, C. A. *et al.* Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 211-217 2001.

FRED-JAIYESIMI, A. A.; ADEPOJU, A.; EGBEBUNNI, O. Anthelmintic activities of chloroform and methanol extracts of *Buchholzia coriacea* Engler seed. **Parasitology Research**, Berlim, v. 109, n. 2, p. 441-444, 2011.

FRIEDMAN, M. *et al.* Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 19, p. 6042-6048, 2004.

GASBARRE, C. L. *et al.* The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 3-4, p. 281-285, 2009.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plant in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRONVOLD, J. *et al.* Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 48, n. 1-4, p. 311-325, 1993.

HAAG, J. D.; LINDSTROM, M. J.; GOULD, M. N. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. **Cancer Research**, Chicago, v. 52, n. 14, p. 4021-4026, 1992.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 213-228, 1997.

HASEGAWA, T. *et al.* Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globules*. **Phytochemistry**, Londres, v. 69, n. 3, p. 747-753, 2008.

HIERRO, I.; VALERO, A.; NAVARRO, M. C. *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 13, n. 7, p. 527-531, 2006.

HOSTE, H. *et al.* Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. **Tropical Biomedicine**, Kuala Lumpur, v. 25, n. 1 (suplemento), p. 56-72, 2008.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, Londres, v. 130, n. 20, p. 442-446, 1992.

ITHARAT, A. *et al.* *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 90, n. 1, p. 33-38, 2004.

KANG, R. *et al.* Antimicrobial activity of the volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 11, p. 2328-2330, 1992.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 477-481, 2004.

KARAMAJ, C.; ABDUL RAHUMAN, A. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal extracts against *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, Londres, v. 91, n. 3, p. 400-404, 2010.

KATIKI, L. M. *et al.* Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 1-2, p. 103-108, 2011.

KOSIF, R. *et al.* Histopathological effects of *Aloe barbadensis* and soybean oil on rat liver. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 24, n. 4, p. 1101-1106, 2010.

KUMAR, P. *et al.* Insecticidal evaluation of essential oils of *Citrus sinensis* L. (Myrtales: Myrtaceae) against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 5, p. 1929-1936, 2012.

LIFSCHITZ, A. *et al.* Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: Comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 172-178, 2010.

LIM, E.G. *et al.* Temperature-dependent fumigant activity of essential oils against twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 104, n. 2, p. 414-419, 2011.

LYNDAL-MURPHY, M. *et al.* Reduced efficacy of macrocyclic lactone treatments in controlling gastrointestinal nematode infections of weaner dairy calves in subtropical eastern Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 168, n. 1-2, p. 146-150, 2010.

MACEDO, I. T. F. *et al.* Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009.

MACEDO, I. T. F. *et al.* Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 1-2, p. 93-98, 2010.

MACHADO, M. *et al.* Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 130, n. 3, p. 223-231, 2012.

MACIEL, M. V. *et al.* Chemical composition of *Eucalyptus spp.* essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 1-7, 2010.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 117-121, 2001.

MONKS, A. *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MONTEIRO, M. V. B. *et al.* Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, n. 2-4, p. 259-263. 2011.

MUELLER-HARVEY, I.; MCALLAN, A. B. Tannins: their biochemistry and nutritional properties, **Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology**, Londres, v. 1, n. 1, p. 151-217, 1992.

NOGUEIRA, F. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. **Parasitology Research**, Berlim, v. 111, n. 1, p. 325-330, 2012.

NOVOBILSKÝ, A.; MUELLER-HARVEY, I.; THAMSBORG, S. M. Condensed tannins act against cattle nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, n. 2-4, p. 213-220, 2011.

PRATES, H. T. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 243-249, 1998.

RAMEZANI, H. *et al.* Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, n. 3, p. 261-262, 2002.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Research**, Victoria, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.

ROCA-PÉREZ, L. *et al.* Seasonal cardenolide production and Dop5betar gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, Londres, v. 65, n. 13, p. 1869-1878, 2004.

SARGISON, N.; WILSON, D.; SCOTT, P. Relative inefficacy of pour-on macrocyclic lactone anthelmintic treatments against *Cooperia* species in Highland calves. **Veterinary Record**, Londres, v. 164, n. 19, p. 603-604, 2009

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews. Cancer**, Londres, v. 6, n. 10, p. 813-823, 2006.

SILVA, J. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 89, p. 277-283, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFSC, 1999. pp. 397-426.

SODER, K. J.; HOLDEN, L. A. Use of nematode-trapping fungi as a biological control in grazing livestock. **The Professional Animal Scientist**, v. 21, n. 1, p. 30-37, 2005.

SOUTELLO, R. G. V.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 360-364, 2007.

SOUZA, A. P. *et al.* Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1363-1367, 2008.

STAFFORD, K.; COLES G. C. Nematode control practices and anthelmintic resistance in dairy calves in the south west of England. **The Veterinary Record**, Londres, v. 144, n. 24, p. 659-661, 1999.

STROMBERG, B. E. *et al.* *Cooperia punctata*: Effect on cattle productivity? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 284-291, 2012.

SUAREZ, V. H.; BEDOTTI, D. O. Effects of na integrated control programme with ivermectin on growth, carcass composition and nematode infection of beef cattle in Argentina's western pampas. **Research in Veterinary Science**, London, v. 50, n. 2, p. 195-199, 1991.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 183-194, 2002.

UEDO, N. *et al.* Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in Wistar rats. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 137, n. 2, p. 131-136, 1999.

WAGHORN, T. S. *et al.* Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 54, n. 6, p. 278-282, 2006.

WALLER, P. J. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, n. 3-4, p. 391-412, 1997.

WALLER, P. J. *et al.* Plants as de-worming agents of livestock in the nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 42, n. 1, p. 31-44 2001.

WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial activity of essential oils from australian native plants. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 19, n. 7, p. 643-646, 2005.

WOHLMUTH, H. *et al.* Essential oil composition of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) grown in Australia. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Washington v. 54, n. 4, p. 1414-1419, 2006.



#### 4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Carapa guianensis* SOBRE FASES PRÉ-ADULTAS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS.

##### RESUMO

Nematódeos gastrintestinais de bovinos causam entraves na saúde e produção animal. O controle desses nematódeos é baseado em drogas anti-helmínticas onde seu uso errôneo resulta na resistência parasitária a qual é conhecida mundialmente. No Brasil, *Cooperia sp* e *Haemonchus sp.* são os principais parasitas de bovinos. Extratos de plantas têm sido investigados na redução do impacto do parasitismo. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade do óleo de *Carapa guianensis* em nematódeos de bovinos pelos testes de eclodibilidade de ovos (TEO) migração de larvas em ágar (TMLA). Ovos de nematódeos foram inseridos em placas de 24 poços com concentrações do óleo essencial variando de 0,60 a 38,6 mg/mL em e incubados por 24 horas. A leitura foi feita em microscópio invertido. Para o TMLA, larvas de *Cooperia* foram inseridas em placas de 24 poços com concentrações de 0,60 a 38,6 mg/mL e incubados por 6 horas. Posteriormente, as placas receberam 1 mL de ágar em cada poço e toda a solução foi transferida para aparatos e incubados. Após 18 horas, esses aparatos foram retirados da incubação e a água foi centrifugada. Cada *pellet* foi transferido para placas de 24 poços para leitura em microscópio invertido. O óleo essencial não obteve eficácia nas concentrações testadas. Pela cromatografia gasosa, os ácidos palmítico e oleico foram os principais compostos identificados. Outras metodologias devem ser realizadas para pesquisa de efeito anti-helmíntico de *Carapa guianensis*.

Palavras-chave: Parasita, planta, doença, andiroba.

## **IN VITRO EVALUATION OF *Carapa guianensis* ESSENTIAL OIL ON YOUNG STAGES OF GASTROINTESTINAL NEMATODES OF CATTLE.**

### **ABSTRACT**

Gastrointestinal nematodes of cattle cause problems in the animal health and production. The control of these nematodes is made by anthelmintic drugs where its erroneous use results on the parasitic resistance worldwide. In Brazil, *Cooperia sp.* and *Haemonchus sp.* are the main parasites. Plant extracts have been investigated to reduce the impact of parasitism. Our study aimed to test the *in vitro* activity of *Carapa guianensis* oil on nematodes of cattle by egg hatch test (EHT) and larval migration in agar test (LMAT). Eggs from nematodes were added in 24 wells plates with concentrations from 0.60 to 38.6 mg/mL and incubated. After 24 hours, the reading was made under inverted microscope. For the LMAT, *Cooperia sp.* larvae were inserted in 24 wells plates with concentrations from 0.60 to 38.6 mg/mL in and incubated for 6 hours. Afterwards the plates received 1 ml of gelled agar in each well and all solution was transferred to apparatuses and incubated. After 18 hours these apparatuses were taken out from incubation and the water was transferred to tubes and centrifuged. Each pellet was transferred to 24 wells plates for reading under inverted microscope. The essential oil did not obtain efficacy on the tested concentrations. Chromatography, revealed that palmitic and oleic acids were the principal compounds identified. Other tests must be made to research the anthelmintic effect of *Carapa guianensis*.

Keywords: Parasite, plant, disease, andiroba.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Os nematódeos gastrintestinais são responsáveis por causar problemas econômicos devido a queda na produtividade e também pela mortalidade de ruminantes ao redor do mundo (ABIDU-FIGUEIREDO *et al.*, 2011; AMARANTE, 2004; PENELUC *et al.*, 2009). O controle desses parasitas tem sido por drogas anti-helmínticas devido a sua eficiência, praticidade e facilidade de aquisição. Porém, seu uso é feito de forma errônea sem critérios epidemiológicos (RANGEL, 2003; MOLENTO, 2005; KARAMAJ; RAHUMAN, 2010).

A resistência foi primeiramente reconhecida em pequenos ruminantes (PRICHARD, 1994) e o número de relatos aumentou na última década sendo descritos na Oceania (WAGHORN *et al.*, 2006; LYNDAL-MURPHY *et al.*, 2010), Europa (DEMELEER *et al.*, 2009; SARGISON; WILSON; SCOTT, 2009), África (BENTOUNSI; KHAZNADAR; CABARET, 2012) e Américas do Norte, Central e Sul (ANZIANI *et al.*, 2004; FIEL *et al.*, 2001; SUAREZ; CRISTEL, 2007; GASBARRE *et al.*, 2009; CANUL-KU *et al.*, 2012)

O problema da resistência em parasitas de bovinos à drogas anti-helmínticas está em crescimento no Brasil (SOUZA *et al.*, 2008). Foram reportados casos nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Rio Grande do Sul evidenciando *Cooperia sp.* e *Haemonchus sp.* como os principais nematódeos. (SOUTELLO; SENO; AMARANTE, 2007; CONDI; SOUTELLO; AMARANTE, 2009; BORGES *et al.*, 2008; CARDOSO, *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2008; CEZAR *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011).

Dessa forma, novas alternativas tem sido estudadas para reduzir o impacto da resistência às drogas em ruminantes, como o uso de raças resistentes (BRICARELLO *et al.*, 2007), fungos nematófagos (GRONVOLD *et al.*, 1993; SODER; HOLDEN, 2005) e também princípios ativos derivados de plantas (ADEMOLA; ELOFF, 2011).

Existe um crescente interesse nos estudos com extratos de plantas, pois seus compostos bioativos possuem alta biodegradabilidade, são importantes para o desenvolvimento de novas drogas, têm efeito promissor contra helmintos e são potencialmente sustentáveis (HAMMOND; FIELDING; BISHOP, 1997; NOGUEIRA, D. M.; MOREIRA; CARLOS, 2006; KARAMAJ; RAHUMAN, 2010).

Alguns casos de tratamento de parasitoses com plantas foram descritos ao redor do mundo (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMBORG, 2006) e estudos sobre efeitos de plantas em nematódeos de ovinos e caprinos são crescentes (MONTEIRO *et al.*, 2011; NOGUEIRA, F. A. *et al.*, 2012), porém em bovinos existem poucos relatos na literatura (FRED-JAIYESIMI; ADEPOJU; EGBEBUNNI, 2011; NOVOBILSKY *et al.*, 2011).

Pertencente à família Meliaceae, *Carapa* é conhecida como um gênero transatlântico. Espécies desse gênero são encontradas na América Central, norte da América do Sul, África e oeste da Índia. (KENFACK, 2011a; KENFACK, 2011b).

Espécies do gênero mostraram atividades como filaricida em *Onchocerca volvulus* (TITANJI *et al.*, 1990), e bactericida contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (UDOUMOH *et al.*, 2011). A *Carapa guianensis* pode ser encontrada no Caribe, América Central e América do Sul (CLOUTIER *et al.*, 2007). A espécie habita a floresta amazônica onde, no Brasil, seu óleo é usado devido suas propriedades medicinais, havendo relatos de tratamentos de várias enfermidades (HAMMER; JOHNS, 1993). Essa planta também é utilizada na fabricação de velas repelentes (GILBERT *et al.*, 1999).

Estudos sobre a *Carapa guianensis*, popularmente conhecida como “andiroba” no Brasil, têm relatado efeito larvicida e repelente contra *Aedes sp.* (MIOT *et al.*, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; PROPHIRO *et al.*, 2012), antialérgico e anti-inflamatório (PENIDO *et al.*, 2005; PENIDO *et al.*, 2006), acaricida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FARIAS *et al.*, 2007), *Anocentor nitens* (FARIAS *et al.*, 2009), anti-helmíntico em *Haemonchus sp.*, *Oesophagostomum sp.* e *Trichostrongylus sp.* (FARIAS *et al.*, 2010), antiplasmodial contra *Plasmodium falciparum* (MIRANDA-JÚNIOR *et al.*, 2012) e pediculicida contra *Felicola subrostratus* (BARROS *et al.*, 2012). Em *Rhipicephalus sanguineus*, o óleo de andiroba teve efeito acaricida e potente ação na redução e/ou prevenção da reprodução de fêmeas não sendo uma ameaça para o ambiente como no caso dos acaricidas químicos (FARIAS *et al.*, 2009; VENDRAMINI *et al.*, 2012).

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do óleo essencial de *Carapa guianensis* em nematódeos gastrintestinais de bovinos utilizando testes *in vitro*.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Nematódeos de bovinos

Aproximadamente 4.000 Larvas de terceiro estágio L<sub>3</sub> de *Cooperia sp.* oriundas do estado do Mato Grosso do Sul e obtidas de coproculturas foram utilizadas para infectar artificialmente um bezerro da raça Holandesa de seis meses de idade livre de parasitas o qual foi mantido no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. O animal recebeu alimentação e água *ad libitum* e foi mantido estabulado até que o número suficiente de ovos de nematódeos fosse obtido para a realização do teste de eclodibilidade de ovos (TEO) (COLES *et al.*, 1992) e novas coproculturas.

### 4.2.2 Óleo essencial

O óleo de semente de *Carapa guianensis* foi obtido comercialmente da WNF Indústria e Comércio Ltda. e testado no TEO e no teste de migração de larvas (TMLA) usando concentrações preparadas com Tween 80 e água destilada formando uma emulsão estável pela sua mistura usando agitador vórtex.

### 4.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS)

Esse procedimento foi realizado pela Embrapa Agroindústria de Alimentos. A análise química foi realizada com o equipamento Agilent modelo 5973N equipado com coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0.25 µm). O hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL / minuto. O óleo foi diluído em solução de diclorometano e injetado por injetor aquecido a 250°C. A temperatura do forno variou de 60 a 240°C à um aquecimento de 3°C / minuto. O impacto eletrônico foi

selecionado a 70 eV. Os índices de retenção (RI) dos óleos foram determinados pelos padrões de hidrocarbonetos injetados nas mesmas condições. Os componentes do óleo foram identificados por comparação com um banco de dados da literatura.

#### 4.2.4 Testes *in vitro*

##### 4.2.4.1 Recuperação de ovos

Essa metodologia foi realizada de acordo com o descrito por Bizimenyera *et al.*, (2006) com algumas adaptações. Fezes frescas foram coletadas da ampola retal de um bezerro infectado com nematódeos gastrintestinais e misturadas em água a 37°C. Posteriormente essa mistura foi filtrada por tamises de 250, 150, 75 e 25 µm de abertura. Essa última peneira foi lavada com água destilada para recuperar os ovos retidos. Após isso, o conteúdo foi transferido para tubos de 15 mL e centrifugado a 3.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e solução uma saturada de NaCl foi adicionada aos tubos para nova centrifugação. O sobrenadante foi despejado em peneira de 25 µm para a recuperação dos ovos com água destilada. O conteúdo foi transferido para um Becker e os ovos foram quantificados em três alíquotas de 20 µL. Posteriormente, esse volume foi ajustado para se obter aproximadamente 100 ovos por alíquota e utilizar no teste de eclodibilidade de ovos.

##### 4.2.4.2 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)

Ovos de nematódeos gastrintestinais foram adicionados em placas de 24 poços (100 ovos/poço) contendo diferentes concentrações de *Carapa guianensis* (0,60; 1,20; 2,41; 4,82; 9,65; 19,3 e 38,6 mg/mL). Um grupo controle negativo com água e Tween 80 e outro com água e DMSO foram necessários para averiguar a

sensibilidade dos parasitas a esses solventes, uma vez que foram utilizados para diluir o óleo essencial e o Albendazol (controle positivo) respectivamente. Seis repetições foram usadas para cada concentração incluindo os grupos controle. As placas foram incubadas a 27°C e após 24 horas, a leitura do teste foi realizada em microscópio invertido contando-se ovos e larvas de primeiro estágio (L<sub>1</sub>). A eclodibilidade foi calculada pela equação: Eclodibilidade (%) = L<sub>1</sub> / (ovos + L<sub>1</sub>) x 100.

#### 4.2.4.3 Teste de migração de larvas em ágar (TMLA)

O procedimento foi conduzido de acordo com D'Assonville, Janovsky e Verster (1996) modificado por Molento e Prichard (2001) após algumas modificações descritas a seguir.

Para o teste, aparatos foram previamente preparados com uma placa de *Petri* preenchida com água destilada (20 mL), duas malhas plásticas de diferentes aberturas (1 mm e 0,5 mm) na base e um cilindro de PVC acima das malhas. Esses aparatos foram levados ao freezer para congelamento.

Larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) foram desembainhadas com hipoclorito de sódio a 0,3% por 1 hora. Posteriormente, a solução de larvas com hipoclorito foi transferida para tubos e centrifugadas a 3.000 rpm por dois minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram completados com água destilada para uma nova centrifugação. Essa etapa foi repetida três vezes. As larvas foram quantificadas e adicionadas em placas de 24 poços (200 larvas/poço). As concentrações do óleo essencial foram feitas em seis replicatas de 0,60; 1,20; 2,41; 4,82; 9,65; 19,3 e 38,6 mg/mL. As placas foram incubadas a 27°C por seis horas. Posteriormente, 1 mL de gel de ágar a 1,4% foi adicionado em cada poço e toda a solução (larvas, água, óleo e ágar) foi transferida para o aparato previamente preparado. Os aparatos foram incubados à 27°C acima de um foco de luz de 150 MHz durante 18 horas. Essa luz estimulou a motilidade larvar para o deslocamento das larvas do ágar para a água. As placas foram então retiradas da incubação e a solução foi transferida para tubos e centrifugada a 3.000 rpm por dois minutos. Os *pellets* (2 mL) foram transferidos para placas de 24 poços para leitura em microscópio invertido onde houve a contagem de larvas L<sub>3</sub>. Para o controle positivo

foi utilizada a moxidectina diluída em DMSO para obter melhor solubilização em água. A média da quantidade de larvas de cada poço foi convertida em porcentagem de migração pelo programa GraphPad Prism® 5 para Windows.

#### 4.2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey e construção de curva dose-resposta pelo programa GraphPad Prism® 5 para Windows.

### 4.3 RESULTADOS

O óleo de *Carapa guianensis* não demonstrou efeito anti-helmíntico sobre a eclodibilidade e motilidade larvar mesmo na maior concentração de 38,6 mg/mL em ambos os testes contra nematódeos de bovinos.

Nos grupos controle, houve pouca sensibilidade de ovos e larvas sob os solventes (Tabela 6). Pelas coproculturas, foi possível identificar as seguintes espécies de nematódeos: *Cooperia sp.* (89%) e *Trichostrongylus sp.* (11%). A cromatografia gasosa identificou os ácidos oleico e palmítico como as principais substâncias (Tabela 7).

TABELA 6 - RESULTADOS DOS TESTES DE ECLODIBILIDADE DE OVOS (TEO) E MIGRAÇÃO DE LARVAS (TMLA) DE *Carapa guianensis* EM NEMATÓDEOS DE BOVINOS

Concentração (mg/mL)	TEO (%)	TMLA (Média)
Controle negativo (Tween 80)	94,79 <sup>a</sup>	210,33 <sup>a</sup>
Controle negativo (DMSO)	91,07 <sup>a</sup>	209,33 <sup>a</sup>
0,60	93,89 <sup>a</sup>	211,83 <sup>a</sup>
1,20	94,45 <sup>a</sup>	208,17 <sup>a</sup>
2,41	94,74 <sup>a</sup>	209,67 <sup>a</sup>
4,82	94,26 <sup>a</sup>	209,50 <sup>a</sup>
9,65	93,02 <sup>a</sup>	208,33 <sup>a</sup>
19,3	92,75 <sup>a</sup>	217,17 <sup>a</sup>
38,6	93,22 <sup>a</sup>	208,33 <sup>a</sup>
Controle Positivo	0,16 <sup>b</sup> (Albendazol)	3,50 <sup>b</sup> (Moxidectina)

Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,05).

FONTE: O autor (2013)



TABELA 7 - QUANTIDADE DE COMPONENTES ISOLADOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Carapa guianensis* POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Composto	Quantidade (%)
Ácido oléico	46,8
Ácido palmítico	39,0
n.i.	8,7
Alfa-copaeno	2,3
Ácido esterárico	1,7
Palmitato de etila	0,9
Alfa-cubebeno	0,5

FONTE: O autor (2013)

#### 4.4 DISCUSSÃO

Os testes *in vitro* são usados na avaliação de compostos anti-helmínticos para identificação de isolados resistentes a essas drogas (D'ASSONVILLE; JANOVSKY; VERSTER, 1996). O TEO e TMLA foram desenvolvidos para avaliar o embrionamento e a eclosão de ovos de helmintos e a motilidade larvar respectivamente (MOLENTO; PRICHARD, 2001; TAYLOR, M. A.; HUNT; GOODYEAR, 2002). Alguns autores têm reportado atividade anti-helmíntica *in vitro* de óleos essenciais sobre ovos (tabela 8) e larvas (tabela 9) de nematódeos de pequenos ruminantes.

TABELA 8 - EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE OVOS DE NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES EM TESTES DE ECLODIBILIDADE

Óleo essencial	DL 50 (mg/mL)	DL 90-99 (mg/mL)	Autores
<i>Croton zehntneri</i>	0,74	-	Camurça-Vasconcelos <i>et al.</i> (2007)
<i>Lippia sidoides</i>	0,40	-	Camurça-Vasconcelos <i>et al.</i> (2007)
<i>Eucalyptus globulus</i>	8,3	21,75	Macedo <i>et al.</i> (2009)
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	0,324	1,35	Macedo <i>et al.</i> (2010)
<i>Cymbopogon martinii</i>	0,13	0,61	Katiki <i>et al.</i> (2011)
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	0,04	0,27	Katiki <i>et al.</i> (2011)
<i>Mentha piperita</i>	0,26	1,0	Katiki <i>et al.</i> (2011)
<i>Mentha piperita</i>	0,037	0,10	Carvalho <i>et al.</i> (2012)
<i>Lippia sidoides</i>	0,04	0,13	Carvalho <i>et al.</i> (2012)

TABELA 9 - EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAS DE NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES PELO TESTE DE DESENVOLVIMENTO LARVAR

Óleo essencial	DL 50 (mg/mL)	DL 90-99 (mg/mL)	Autores
<i>Croton zehntneri</i>	1,37	-	Camurça-Vasconcelos <i>et al.</i> (2007)
<i>Lippia sidoides</i>	2,97	-	Camurça-Vasconcelos <i>et al.</i> (2007)
<i>Eucalyptus globulus</i>	6,92	43,50	Macedo <i>et al.</i> (2009)
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	1,70	5,40	Macedo <i>et al.</i> (2010)
<i>Cymbopogon martinii</i>	0,15	0,35	Katiki <i>et al.</i> (2011)
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	0,06	0,27	Katiki <i>et al.</i> (2011)
<i>Mentha piperita</i>	0,26	0,91	Katiki <i>et al.</i> (2011)
<i>Mentha piperita</i>	0,018	0,03	Carvalho <i>et al.</i> (2012)
<i>Lippia sidoides</i>	0,002	0,004	Carvalho <i>et al.</i> (2012)

Em um estudo com *Carapa guianensis* foi observado 100% de eficácia em *Haemonchus sp.*, *Oesophagostomum sp.*, *Trichostrongylus sp.* e *Strongyloides sp.* (FARIAS *et al.*, 2010). Porém, essa atividade promissora ocorreu devido ao uso de concentrações elevadas do extrato vegetal variando de 10 a 100%. No presente estudo, 38,6 mg/mL correspondeu à concentração de 5% do óleo essencial. Maiores concentrações não foram utilizadas em nosso trabalho bem como por outros autores pelo alto custo, praticidade e futura aplicabilidade. Além disso, altas concentrações necessitam de grande quantidade de solvente podendo ser tóxico ao animal e também causar contaminação ambiental (CARVALHO *et al.*, 2012; CHAGAS *et al.*, 2012).

Pela cromatografia gasosa, houve a identificação dos ácidos oleico e palmítico e pequenas quantidades de terpenos os quais têm sido relatados como responsáveis por efeitos inseticidas (TAYLOR, D. A. H, 1984; ISMAN, 2000; MIOT *et al.*, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; PROPHIRO *et al.*, 2012). A baixa quantidade desses terpenóides pode ser suficiente para obter resultados promissores, como em um estudo com larvas de *Aedes aegypti*, que demonstrou uma DL50 de 36 a 128 µg/mL em diferentes estágios larvais (SILVA *et al.*, 2006) e variando de 136 a 139 µg/mL em linhagens de diferentes municípios do estado do Paraná (PROPHIRO *et al.*, 2012). Miranda Júnior *et al.* (2012) encontraram 100% de eficácia a 8,2 µg/mL contra o protozoário *Plasmodium falciparum* sensível a mefloquina e resistente a cloroquina. Apesar da quantidade de terpenos de *C. guianensis* acarretar atividade inseticida e antiplasmodial, no caso dos nematódeos,

sua concentração pode ter sido insuficiente como visto no presente trabalho e no estudo realizado por Carvalho *et al.* (2012) onde os autores utilizaram o teste de desenvolvimento larvar (TDL) não obtendo efeito anti-helmíntico em ovos e pouca atividade em larvas.

Sugere-se que para se obter resultados promissores de óleo essenciais contra helmintos, seriam necessárias grandes quantidades de terpenos em sua composição como demonstrado em estudo com outros óleos como *Croton zehntneri*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus*, *Mentha piperita*, que contem anetol, timol, geraniol e mentol como principais terpenóides em altas concentrações (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007; KATIKI *et al.*, 2011).

Outras metodologias devem ser empregadas para a avaliação de *Carapa guianensis* contra helmintos como o teste de inibição da alimentação larvar em que larvas L<sub>1</sub> são desafiadas a se alimentarem de *Escherichia coli* liofilizada e conjugada ao isotiocianato de fluoresceína e a leitura é feita em microscópio de fluorescência (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2005). Outro teste que poderia ser empregado é o de eliminação de cutícula o qual avalia a capacidade do extrato vegetal de inibir a perda cuticular de larvas L<sub>3</sub> estimulada por hipoclorito de sódio (BAHUAUD *et al.*, 2006).

Devido à existência de outros métodos, não se descarta a possibilidade de *C. guianensis* possuir efeito anti-helmíntico.

#### 4.5 CONCLUSÃO

O óleo de *Carapa guianensis* apresentou resultado insatisfatório na avaliação *in vitro* com ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de bovinos.

## REFERÊNCIAS

ABIDU-FIGUEIREDO, M. *et al.* Diagnóstico de larvas de primeiro estágio de nematoides gastrintestinais de bezerros leiteiros do município de Paty do Alferes-RJ. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 313-318, 2011.

ADEMOLA, I. O.; ELOFF, J. N. Anthelmintic activity of acetone extract and fractions of *Vernonia amygdalina* against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Tropical Animal Health and Production**, Boston, v. 43, n. 2, p. 521-527, 2011.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A. *et al.* The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 56-61, 2005.

AMARANTE, A. F. Controle Integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, n. 1, p. 68-71, 2004.

ANZIANI, O. S. *et al.* Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p.303-306, 2004.

BARROS F. N. *et al.* *In vitro* efficacy of oil from the seed of *Carapa guianensis* (andiroba) in the control of *Felicola subrostratus*. **Brasilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 22, n. 5, p. 1130-1133, 2012.

BAHUAUD, D. *et al.* Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. **Parasitology**, Londres, v. 132, p. 545-554, 2006.

BENTOUNSI, B.; KHAZNADAR, A.; CABARET, J. Resistance of *Trichostrongylus* spp. (Nematoda) to benzimidazole in Algerian cattle herds grazed with sheep. **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 2, p. 1021-1023, 2012.

BIZIMENYERA, E. S. *et al.* *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 3-4, p. 336–343, 2006.

BORGES, F. A. *et al.* Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25% ivermectin + 1.25% abamectin in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, n. 3-4, p. 299-307, 2008.

BRICARELLO, P. A. *et al.* Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 272-278, 2007.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. *et al.* Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 288-294, 2007.

CANUL-KU, H. L. *et al.* Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 292-298, 2012.

CARDOSO, J. M. S. *et al.* Identification of ivermectin and doramectin-resistant *Cooperia punctata* (LINSTOW, 1907) in a dairy herd in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, suplemento, p. 75-81, 2008.

CARVALHO, C. O. *et al.* The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 260-268, 2012.

CEZAR, A. S. *et al.* Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 7, p. 523-528, 2010.

CHAGAS A. C. S. *et al.* *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 1, p. 295-303, 2012.

CLOUTIER D. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 797-809, 2007.

CONDI, G. K.; SOUTELLO, R. G. V.; AMARANTE, A. F. T. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 161, n. 3-4, p. 213-217, 2009.

COSTA, M. S. V. L. F. *et al.* Anthelmintic resistance in a dairy cattle farm in the state of Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2011.

D'ASSONVILLE, J. A.; JANOVSKY, E.; VERSTER A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 61, n. 1-2, p. 73-80, 1996.

DEMELER, J. *et al.* Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 109-115, 2009.

FARIAS, M. P. O. *et al.* Eficácia *in vitro* do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 68-71, 2007.

FARIAS, M. P. O. *et al.* Potencial acaricida do óleo de andiroba *Carapa guianensis* Aubl. sobre fêmeas adultas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 877-882, 2009.

FARIAS, M. P. O. *et al.* Avaliação *in vitro* dos efeitos do óleo da semente de *Capara guianensis* Aubl. sobre larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 220-226, 2010.

FIEL, C. A. *et al.* Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 211-217, 2001.

FRED-JAIYESIMI, A. A.; ADEPOJU, A.; EGBEBUNNI, O. Anthelmintic activities of chloroform and methanol extracts of *Buchholzia coriacea* Engler seed. **Parasitology Research**, Berlim, v. 109, n. 2, p. 441-444, 2011.

GASBARRE, C. L. *et al.* The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 3-4, p. 281-285, 2009.

GILBERT B, *et al.* Activities of the Pharmaceutical Technology Institute of the Oswaldo Cruz Foundation with medicinal, insecticidal and insect repellent plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 2, p. 265–271, 1999.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plant in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

GRONVOLD, J. *et al.* Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 48, n. 1-4, p. 311-325, 1993.

HAMMER, M. L. A.; JOHNS, E. A. Tapping na Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 40, n. 1, p. 53-75, 1993.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 21, p. 213-228, 1997.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 19, n. 8-10, p. 603-608, 2000.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 477-481, 2004.

KARAMAJ, C.; ABDUL RAHUMAN, A. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal extracts against *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, Londres, v. 91, n. 3, p. 400-404, 2010.

KATIKI, L. M. *et al.* Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 1-2, p. 103-108, 2011.

KENFACK D. *Carapa vasquezii* (Meliaceae), a new species from western Amazonia. **Brittonia**, Bronx, v. 63, n. 1, p. 7-10, 2011.

KENFACK D. Resurrection in *Carapa* (Meliaceae): a reassessment of morphological variation and species boundaries using multivariate methods in a phylogenetic context. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 165, n. 2, p. 186-221, 2011.

LYNDAL-MURPHY, M. *et al.* Reduced efficacy of macrocyclic lactone treatments in controlling gastrointestinal nematode infections of weaner dairy calves in subtropical eastern Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 168, n. 1-2, p. 146-150, 2010.

MACEDO, I. T. F. *et al.* Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009.

MACEDO, I. T. F. *et al.* Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 1-2, p. 93-98, 2010.

MENDONÇA, F. A. C. *et al.* Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, n. 7-8, p. 629-636, 2005.

MIOT, H. A. *et al.* Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and deet 50% as repellent for *Aedes* sp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 253-256, 2004.

MIRANDA-JÚNIOR, R. N. C. *et al.* Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 142, n. 3, p. 1-5, 2012.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de eqüídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1469-1477, 2005.

MONTEIRO, M. V. B. *et al.* Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, n. 2-4, p. 259-263, 2011.



NOGUEIRA, D. M.; MOREIRA, J. N.; CARLOS, J. F. Avaliação de plantas medicinais no controle de nematódeos gastrintestinais de caprinos criados em sistema de base agroecológica. **Revista Científica de Produção Animal**, Teresina, v. 8 n. 2, p. 35-40, 2006.

NOGUEIRA, F. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. **Parasitology Research**, Berlim, v. 111, n. 1, p. 325-330, 2012.

NOVOBILSKÝ, A.; MUELLER-HARVEY, I.; THAMSBORG, S. M. Condensed tannins act against cattle nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, n. 2-4, p. 213-220, 2011.

PENELUC, T. *et al.* Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, supl. 1, p. 43-48, 2009.

PENIDO, C. *et al.* Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflammation Research**, Basel, v. 54, n. 7, p. 295-303, 2005.

PENIDO, C. *et al.* Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**, Basel, v. 55, n. 11, p. 457-464, 2006.

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 54, n. 1-3, p. 259-268, 1994.

PROPHIRO J. S. *et al.* First report on susceptibility of wild *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using *Carapa guianensis* (Meliaceae) and *Copaifera* sp. (Leguminosae). **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 2, p. 699-705, 2012.

RANGEL, V. B. **Avaliação de derivados de lactonas macrocíclicas contra infestações naturais de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae), *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera:Cuterebridae) e de infecções por helmintos gastrintestinais, em bovinos de corte.** 2003. 54f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003

SARGISON, N.; WILSON, D.; SCOTT, P. Relative inefficacy of pour-on macrocyclic lactone anthelmintic treatments against *Cooperia* species in Highland calves. **Veterinary Record**, Londres, v. 164, n. 19, p. 603-604, 2009

SILVA O. S. Larvicidal effect of andiroba oil, *Carapa guianensis* (Meliaceae), against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 22, n. 4, p. 699-701, 2006.

SODER, K. J.; HOLDEN, L. A. Use of nematode-trapping fungi as a biological control in grazing livestock. **The Professional Animal Scientist**, v. 21, n. 1, p. 30-37, 2005.

SOUTELLO, R. G. V.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 360-364, 2007.

SOUZA, A. P. *et al.* Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1363-1367, 2008.

STROMBERG, B. E. *et al.* *Cooperia punctata*: Effect on cattle productivity? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 284-291, 2012.

SUAREZ, V. H.; BEDOTTI, D. O. Effects of na integrated control programme with ivermectin on growth, carcass composition and nematode infection of beef cattle in Argentina's western pampas. **Research in Veterinary Science**, London, v. 50, n. 2, p. 195-199, 1991.

TAYLOR, D. A. H. The chemistry of the limonoids from meliaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, Viena, v. 45, n. 1, p. 1-102, 1984.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 183-194, 2002.

TITANJI, V. P. K. *et al.* Novel *Onchocerca volvulus* filaricides from *Carapa procera*, *Polyalthia suaveolens* and *Pachypodanthium staudtii*. **Acta Leidensia**, Leiden, v. 59, n. 1, p. 377-382, 1990.

UDOUMOH A. F. *et al.* Antibacterial and surgical wound healing properties of ethanolic leaf extracts of *Swietenia mahogoni* and *Carapa procera*. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 6, n. 6, p. 272-277, 2011.

VENDRAMINI M. C. R. *et al.* Cytotoxic effects of andiroba oil (*Carapa guianensis*) in reproductive system of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. **Parasitology Research**, Berlín, v. 111, n. 5, p. 1885-1894, 2012.

WAGHORN, T. S. *et al.* Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 54, n. 6, p. 278-282, 2006.

## 5 EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* e *Mentha piperita* EM OVOS E LARVAS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS

### RESUMO

Plantas e seus derivados têm sido estudados para reduzir o impacto das endoparasitoses de bovinos. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia dos óleos essenciais de *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* e *Mentha piperita* contra nematódeos de bovinos nos testes de eclodibilidade de ovos (TEO) e de migração larvar em ágar (TMLA). Ovos de nematódeos foram inseridos em placas de 24 poços com diferentes concentrações para cada óleo em seis repetições e incubados por 24 horas. Posteriormente, a leitura foi realizada em microscópio invertido. No TMLA, larvas L<sub>3</sub> foram adicionadas em placas de 24 poços contendo diferentes concentrações em seis repetições e incubadas. Após 6 horas, as placas receberam 1 mL de ágar em cada poço e as soluções com ágar foram transferidas para aparatos onde foram incubados por 18 horas e, posteriormente, esses aparatos foram retirados da incubação e as soluções foram transferidas para tubos e centrifugadas. Cada *pellet* foi transferido para placas de 24 poços para leitura em microscópio invertido. As DL 50 de *C. martinii*, *C. schoenanthus* e *M. piperita* foram 0,22; 0,26 e 0,43 mg/mL respectivamente no TEO enquanto que no TMLA foram 17,47; 12,29 e 16,82 mg/mL respectivamente. Geraniol, geranial, neral e mentol foram os principais compostos identificados pela cromatografia gasosa. No teste de toxicidade em células, não houve atividade antiproliferativa. Os testes demonstraram atividades ovicida e larvica dos óleos essenciais podendo ser utilizados para futuros testes clínicos em bovinos. Porém testes de eficácia *in vivo* devem ser realizados.

Palavras-chave: Gado, vegetal, verme, nematoda.

## ANTHELMINTIC EFFECT OF *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* ON EGGS AND LARVAE OF GASTROINTESTINAL NEMATODES OF CATTLE

### ABSTRACT

Plants and its derivatives have been studied to reduce the parasite impact in livestock. The objective of this study was to evaluate the efficacy of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils against cattle nematodes on the egg hatch test (EHT) and larval migration in agar test (LMAT). Nematode eggs were added into 24 wells plates with different concentrations to each oil in six replicates and incubated for 24 hour. Afterwards, the reading was performed under inverted microscope. By LMAT, L<sub>3</sub> larvae were added into 24 wells plates with different concentrations in six replicates and incubated. After 6 hours, the plates received 1 mL agar each well and the solutions with agar were transferred to apparatuses where were 18 hours incubated and afterwards, these apparatuses were taken out from incubation and the solutions were transferred to tubes and centrifuged. Each *pellet* was transferred to 24 wells plates for reading under inverted microscope. The LD 50 of *C. martinii*, *C. schoenanthus* and *M. piperita* were 0.22, 0.26 e 0.43 mg/mL respectively on the EHT while on the LMAT were 17.47, 12.29 and 16.82 mg/mL respectively. Geraniol, geranial, neral and menthol were the main compounds indentified by gas chromatography. On the cell toxicity, there was not activity. The tests demonstred ovicidal and larvicidal activity of essencial oils which can be used for future tests in cattle. However, toxicological tests in rats/mice as well as *in vivo* must be performed.

Keywords: Livestock, plant, worm, nematode.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Os nematódeos gastrintestinais representam uma causa importante de doenças e perdas na produção pecuária ao redor do mundo e, há décadas, o controle dessas enfermidades está baseado principalmente no uso de medicamentos anti-helmínticos (DEMELER *et al.*, 2012). O uso intensivo dessas drogas resulta na seleção de nematódeos resistentes bem como em um aumento da população parasitária a qual pode ser tolerante à presença desses compostos (PRICHARD, 1994) bem como a contaminação ambiental pela eliminação dos princípios ativos através das fezes (HAMMOND; FIELDING; BISHOP, 1997).

Os primeiros relatos de resistência aos endectocidas foram descritos em ovinos (CONWAY, 1964; DRUDGE *et al.*, 1964). Em relação aos bovinos o problema foi descoberto mais tarde (EAGLESON; BOWIE, 1986) e, posteriormente, houve um aumento no número de casos no mundo (VERMUT; WEST; POROY, 1995; COLES; STAFFORD; MACKAY, 1998; FIEL *et al.*, 2001; SIEVERS; FUENTEALBA, 2003; ANZIANI *et al.*, 2004; WAGHORN *et al.*, 2006; SUAREZ; CRISTEL, 2007; DEMELER *et al.*, 2009; GASBARRE *et al.*, 2009; LYNDAL-MURPHY *et al.*, 2010; BENTOUNSI *et al.*, 2012; CANUL-KU *et al.*, 2012) incluindo o Brasil (RANGEL *et al.*, 2005; MELLO *et al.*, 2006; SOUTELLO *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2008; CARDOSO, J. M. S. *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2008; CONDI *et al.*, 2009; CEZAR *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011; ALMEIDA, G. D. *et al.*, 2013).

Apesar do grande número de anti-helmínticos presentes no mercado, o desenvolvimento da resistência é inevitável, e esse fato torna importante a pesquisa por novas fontes de tratamento (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2005). Vacinas (BASSETTO *et al.*, 2011; PIEDRAFTA *et al.*, 2012), fungos nematófagos (BUSKE *et al.*, 2012; WANG, J.; WANG, R.; YANG, 2013), raças resistentes (BRICARELLO *et al.*, 2007) e extratos de plantas (MACEDO *et al.*, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2012; AL-ROFAAI *et al.*, 2012) têm obtido alguns resultados *in vitro* interessantes.

Os extratos vegetais têm sido investigados mundialmente como uma possível alternativa no combate às endoparasitoses e destacam-se como importantes fontes no desenvolvimento de novos medicamentos (ANTHONY; FYFE; SMITH, 2005) devido ao baixo custo, disponibilidade e biodegradabilidade. Entretanto, para que essas drogas sejam aceitas, é necessário que esses produtos obtenham boa

eficácia e segurança em organismos vivos (HAMMOND; FIELDING; BISHOP, 1997; RATES, 2001; TORRES-ACOSTA; HOSTE, 2008).

Recentes estudos têm relatado plantas com características bioativas contra parasitas ao redor do mundo (WALLER *et al.*, 2001; GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006). Nos países em desenvolvimento, plantas ou até mesmo seus derivados são utilizados no tratamento de casos de parasitismo (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006) e pesquisas com extratos em nematódeos de ovinos e caprinos são crescentes, porém em bovinos, poucos estudos têm sido publicados (FRED-JAIYESIMI; ADEPOJU; EGBEBUNNI, 2011; NOVOBILSKÝ; MUELLER-HARVEY; THAMSBORG, 2011).

Pertencente à família Poaceae, o gênero *Cymbopogon* encontrado na Ásia, América do Sul, América Central, África e outros países tropicais (SHAH *et al.*, 2011), é cultivado para fins cosméticos e farmacêuticos (GANJEWALA; LUTHRA, 2010). Estudos têm revelado várias atividades promissoras do gênero em bactérias, fungos e insetos bem como tratamento de convulsões e reações inflamatórias (BILLERBECK *et al.*, 2001; SCHUCK *et al.*, 2001; PARANAGAMA *et al.*, 2003; TCHOUMBOUGNANG *et al.*, 2005; ALMEIDA, R. B. A. *et al.*, 2008; NYAMADOR *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; FIGUEIRINHA *et al.*, 2010; SINGH, B. R. *et al.*, 2011; PHASOMKUSOLSIL; SOONWERA, 2011). A espécie *Cymbopogon martinii* já foi relatada possuindo atividade contra fungos responsáveis por doenças em humanos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton rubrum* (DUARTE *et al.*, 2005; BANSOD; RAI, 2008; PRASAD *et al.*, 2009) bem como nos nematódeos *Caenorhabditis elegans* (KUMARAN *et al.*, 2003) e *Haemonchus contortus* (KATIKI *et al.*, 2011). Já a espécie *Cymbopogon schoenanthus* tem sido reportada com efeito promissor contra pragas responsáveis por problemas na agricultura (KETOH *et al.*, 2005, 2006; ADJRAH *et al.*, 2012). Há também estudos com atividade antimicrobiana e antioxidante (KHADHRI; MOKNI; ARAÚJO, 2011; KHADRI *et al.*, 2008, 2010) bem como anti-helmíntica contra o parasita *Haemonchus contortus* (KATIKI *et al.*, 2011).

O gênero *Mentha*, o qual pretence à família Lamiaceae, é encontrado na Europa, Ásia e África do sul (LANGE; CROTEAU, 1999). Suas espécies possuem são economicamente importantes na indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica (KANATT; CHANDER; SHARMA, 2007). Em algumas pesquisas, demonstraram efeito antiviral, antimicrobioano, antifúngico, inseticida, repelente, anti-helmíntico

(ADAM *et al.*, 1998; ALI *et al.*, 1996; OUMZIL *et al.*, 2002; PAPACHRISTOS; STAMOPOULOS, 2002; MIMICA-DUKIC *et al.*, 2003; TRABOULSI *et al.*, 2002; PAVELA, 2005, 2008; MAHBOUBI; HAGHI, 2008; SOKOVIC *et al.*, 2009; DZAMIC *et al.*, 2010; TOLOZA *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2012). Pesquisas com a espécie *Mentha piperita* têm revelado eficácia contra gêneros de vetores de doenças em humanos como *Aedes* e *Culex* (ANSARI *et al.*, 2000; YANG; MA, 2005; ERLER; ULUG; YALCINKAYA, 2006; KUMAR, S.; WAHAB; WARIKOO, 2011), fungos responsáveis por causar dermatofitoses em animais e no homem como *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. tonsurans* (SOKOVIC *et al.*, 2006), *Musca domestica* (KUMAR, P. *et al.*, 2011; MOREY; KHANDAGLE, 2012), *Candida sp.* (HÖFLING *et al.*, 2010), Herpes virus tipos 1 e 2 (SCHUHMACHER; REICHLING; SCHNITZLER, 2003; NOLKEMPER *et al.*, 2006), na bactéria *Pseudomonas fluorescens* (TYAGI; MALIK, 2010), e importantes parasitas gastrintestinais como *Echinococcus granulosus* (MAGGIORE *et al.*, 2012) e *Haemonchus contortus* (KATIKI *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2012). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito *in vitro* dos óleos essenciais de *C. martinii*, *C. schoenanthus* e *M. piperita* sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de bovinos.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Óleos essenciais

Amostras de *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* e *Mentha piperita* foram obtidas comercialmente (WNF Indústria e Comércio Ltda) e avaliadas nas metodologias *in vitro* de eclodibilidade de ovos (TEO) e migração de larvas em ágar (TMLA) em diferentes concentrações com auxílio do solvente Tween 80 para obter uma melhor emulsão dos óleos em água. Anti-helmínticos comerciais foram utilizados como controle positivo e diluídos em água com auxílio do dimetilsulfóxido (DMSO). Emulsões estáveis dos óleos essenciais com Tween 80 e água foram feitas por agitador bem como o DMSO com o anti-helmíntico sintético para o controle



positivo. Houve dois controles negativos sendo um com água destilada e Tween 80 e outro com água destilada e DMSO.

#### 5.2.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Esse procedimento foi realizado na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas em equipamento Agilent modelo HP 6890 com detector de massas modelo HP 5975 e coluna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Foi usado 1 mL de acetato de etila para dissolver 15 mg de cada óleo essencial. A solução dissolvida foi inserida ao equipamento por injetor automático com as seguintes temperaturas: injetor a 220°C e coluna a 60°C. O forno foi programado para aquecer 3°C/min até a temperatura final de 240°C. O detector de massas foi selecionado a 250°C. O gás de arraste utilizado foi o hélio à um fluxo de 1 mL/min. O impacto eletrônico foi selecionado a 70 eV. Os índices de retenção (RI) dos óleos foram determinados pelos padrões de hidrocarbonetos injetados nas mesmas condições. A identificação dos compostos foi feita por comparação com um banco de dados da literatura (ADAMS, 2007) e uma biblioteca de espectro de massas cedida pelo software do cromatógrafo.

#### 5.2.3 Testes *in vitro*

##### 5.2.3.1 Recuperação de ovos

Esse procedimento foi realizado de acordo com Bizimenyera *et al.* (1996), com algumas adaptações, onde fezes frescas foram colhidas diretamente da ampola retal de um bovino naturalmente infectado e dissolvidas em água a 37°C onde posteriormente esse conteúdo foi filtrado em quatro peneiras de 250, 150, 75 e 25 µm. Os ovos ficaram retidos na última peneira e foram transferidos para tubos com

auxílio de uma pisseta e água destilada. Os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm por cinco minutos para o descarte do sobrenadante, adição de água saturada com NaCl e nova centrifugação para lavagem dos ovos.

#### 5.2.3.2 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)

Os ovos de nematódeos foram inseridos em placas de 24 poços (100 ovos/poço) contendo diferentes concentrações dos óleos essenciais. As concentrações foram de 0,04; 0,08; 0,17; 0,35; 0,70; 1,41; 2,82 e 5,65 mg/mL para *Cymbopogon martinii*, 0,09; 0,18; 0,36; 0,71; 1,43; 2,86 e 5,71 mg/mL para *C. schoenanthus* e 0,09; 0,18; 0,37; 0,74; 1,48; 2,97 e 5,95 mg/mL para *Mentha piperita*. O Tween 80 foi utilizado para melhorar a diluição dos óleos em água destilada. No controle positivo foi utilizado o Albendazol diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) para melhor solubilização em água. Dois controles negativos foram inseridos ao teste sendo um com água destilada e Tween 80 e outro com água destilada e DMSO. As placas foram submetidas à incubação a 27°C por 24 horas. A leitura foi realizada em microscópio invertido e a porcentagem de eclodibilidade foi calculada usando a seguinte equação:  $\text{Eclodibilidade (\%)} = L_1 / (\text{ovos} + L_1) \times 100$ , onde  $L_1$  corresponde às larvas de primeiro estágio.

#### 5.2.3.3 Teste de migração de larvas em ágar (TMLA)

Essa metodologia foi descrita primeiramente por D'Assonville, Janovsky e Verster (1996) e modificada por Molento e Prichard (2001) a qual recebeu algumas modificações descritas a seguir. Larvas em estágio  $L_3$  obtidas por coproculturas (ROBERTS; O'SULLIVAN, 1950) foram desembainhadas por hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 minutos. Posteriormente, ocorreu a lavagem dessas larvas por centrifugação, descarte do sobrenadante e adição de água destilada. Esse procedimento repetiu-se três vezes. As larvas então foram quantificadas e inseridas em placas de 24 poços (200 larvas/poço). As concentrações, testadas

posteriormente em seis repetições, foram de 0,70; 1,41; 2,82; 5,65; 11,31; 22,62 e 45,25 mg/mL para *C. martinii*, 0,71; 1,42; 2,85; 5,71; 11,42; 22,85 e 45,70 mg/mL para *C. schoenanthus* e 0,74; 1,48; 2,97; 5,95; 11,90; 23,80 e 47,60 mg/mL para *M. piperita*. O controle positivo foi feito por moxidectina. As placas foram então incubadas a 27°C por 6h. Após essa incubação, 1 mL de ágar 1,4% foi adicionada em cada poço e toda a solução (ágar + larvas + água + óleo essencial) foi transferida para um aparato previamente preparado com uma placa de *Petri*, duas malhas plásticas de diferentes aberturas (1 mm e 0,5 mm) na base, um cilindro de PVC sobre essas malhas e 20 mL de água destilada congelada. Esses aparatos foram incubados a 27°C sobre uma luz de 150 MHz para estimular a motilidade larvar da solução de ágar para a água destilada. Após 18 horas, o conteúdo de cada aparato foi transferido para tubos de ensaio, os quais foram centrifugados a 3.000 rpm por dois minutos. Uma alíquota de 2 mL foi transferida do fundo de cada tubo para poços de placas de 24 poços para posterior leitura em microscópio invertido realizando a contagem de larvas L<sub>3</sub> de cada poço. A média da quantidade de larvas migradas foi transformada em porcentagem migração pelo programa GraphPad Prism® 5 para Windows.

#### 5.2.3.4 Teste de toxicidade em células

Esta metodologia seguiu o protocolo descrito por Monks *et al.* (1991) onde os óleos essenciais foram analisados quanto a sua atividade antiproliferativa em células tumorais humanas por meio do ensaio da sulforrodamina B (SBR) para a avaliação do crescimento celular.

Oito linhagens celulares cedidas pelo *Frederick Cancer Research & Development Center, National Cancer Institute* (NCI, EUA) foram utilizadas para o estudo. Os tipos celulares foram U251 (glioma), MCF-7 (adenocarcinoma mamário), 786-0 (adenocarcinoma renal), PC-3 (adenocarcinoma prostático), OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovário), HT29 (adenocarcinoma coloretal), K562 (eritroleucêmica) e HaCat (queratinócito humano, célula normal) para o laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas (Campinas, Brasil).

Foram adicionados 100  $\mu$ L de células em meio RPMI/SFB acrescido de estreptomicina em placas de 96 poços. Estas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente os extratos vegetais foram diluídos em DMSO e inseridos nas placas em concentrações de 0,25; 2,5; 25; e 250  $\mu$ g/mL. O controle positivo foi feito pelo quimioterápico doxorribicina. Uma placa controle foi fixada por ácido tricloroacético para a determinação da quantidade celular no momento de adição dos óleos. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e posteriormente as células foram fixadas com ácido tricloroacético, incubadas a 4°C por uma hora e lavadas em água corrente. Após a secagem em temperatura ambiente, as placas foram coradas com SRB 0,4% (50  $\mu$ L) dissolvida em ácido acético 1%. Após esse procedimento, as placas foram lavadas com ácido acético 1% e novamente submetidas à secagem em temperatura ambiente. A adição de Trizma Base foi realizada para a ressuspensão do corante ligado às proteínas celulares. A leitura foi realizada por meio da espectrofotometria da absorbância em 540 nm em leitor de microplacas.

#### 5.2.4 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey e construção de curva dose-resposta pelo programa GraphPad Prism® 5.

Para o teste de toxicidade, foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento para cada linhagem celular utilizando o programa Origin® 8 para Windows. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a NCI.

## 5.4 RESULTADOS

As amostras testadas obtiveram atividade ovicida como demonstrado na tabela 10. As dosagens capazes de inibir 50% da eclodibilidade (DL 50) foram de

0,22 mg/mL para *C. martinii*, 0,26 mg/mL para *C. schoenanthus* e 0,43 mg/mL para *M. piperita*.

Os testes com larvas resultaram em uma DL 50 de 17,47 mg/mL (*C. martinii*), 12,29 mg/mL (*C. schoenanthus*) e 16,82 mg/mL (*Mentha piperita*). Houve pouca sensibilidade de ovos e larvas aos solventes. Pelas coproculturas foi possível observar a presença de *Cooperia sp.* (77%), *Trichostrongylus sp.* (17%) e *Ostertagia sp.* (6%).

Nos testes de toxicidade em células, os três óleos essenciais não apresentaram atividade antiproliferativa. O efeito foi detectado somente na maior concentração (Tabelas 11 e 12) (Figura 4).

Pela cromatografia gasosa os compostos identificados em maior quantidade foram geraniol e acetato de geranila para *C. martinii*, geraniol, geranial e neral para *C. schoenanthus*, mentol e mentofurano para *M. piperita* (tabela 13).

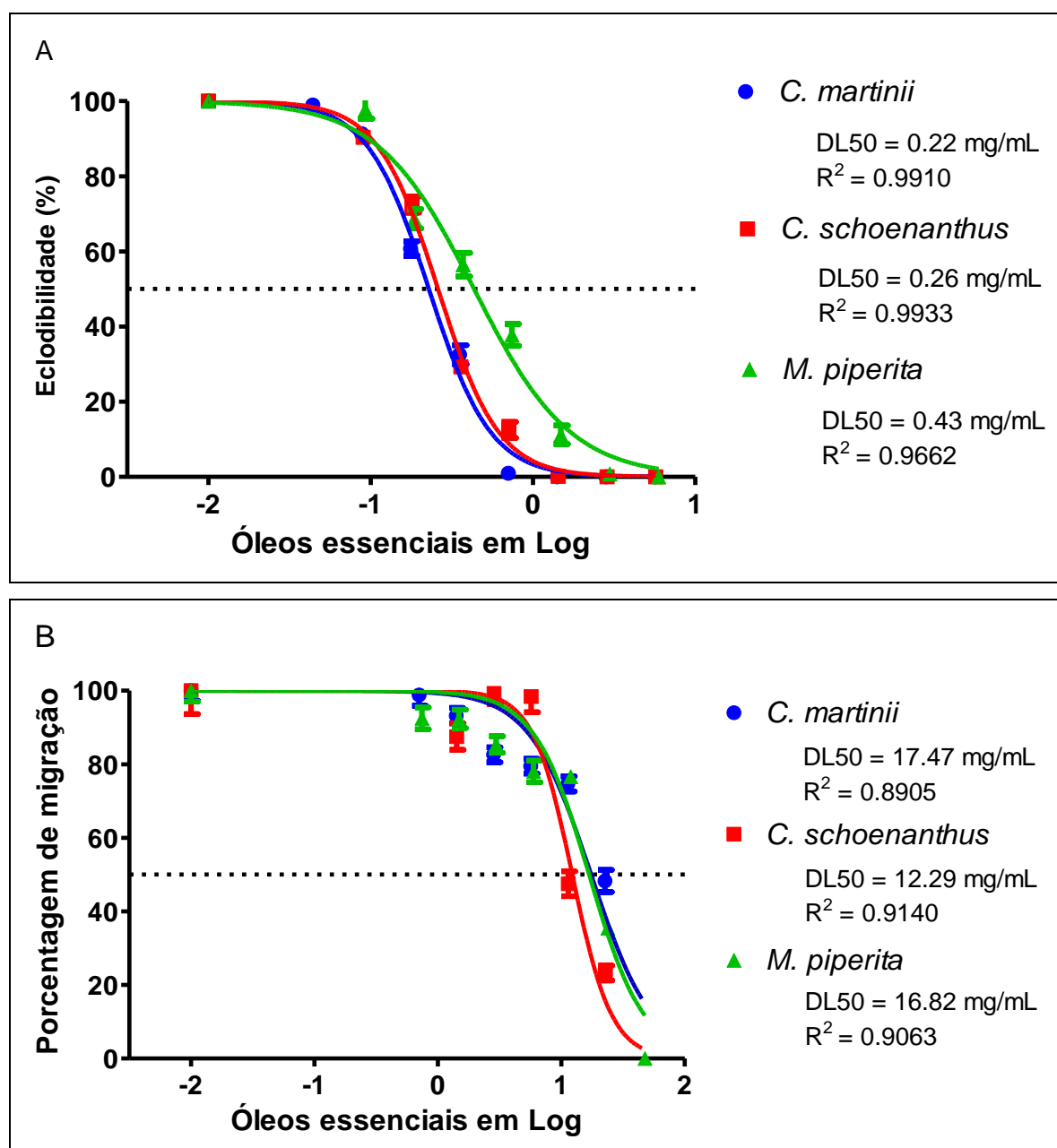


Figura 5 – Curvas dose-resposta dos óleos essenciais de *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* e *Mentha piperita* nos testes de eclodibilidade de ovos (A) e migração de larvas (B) contra nematódeos de bovinos.

FONTE: O autor (2013)

TABELA 10 - DL 50 E 99 DOS ÓLEOS DE *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* e *Mentha piperita* NOS TESTES DE ECLODIBILIDADE DE OVOS (TEO) E MIGRAÇÃO DE LARVAS (TMLA) (mg/mL) PARA NEMATÓDEOS DE BOVINOS

Óleo essencial	TEO		TMLA	
	DL 50	DL 99	DL 50	DL99
<i>C. martinii</i>	0,22	0,70	17,47	-
<i>C. schoenanthus</i>	0,26	1,43	12,29	-
<i>M. piperita</i>	0,43	2,98	16,82	-

FONTE: O autor (2013)

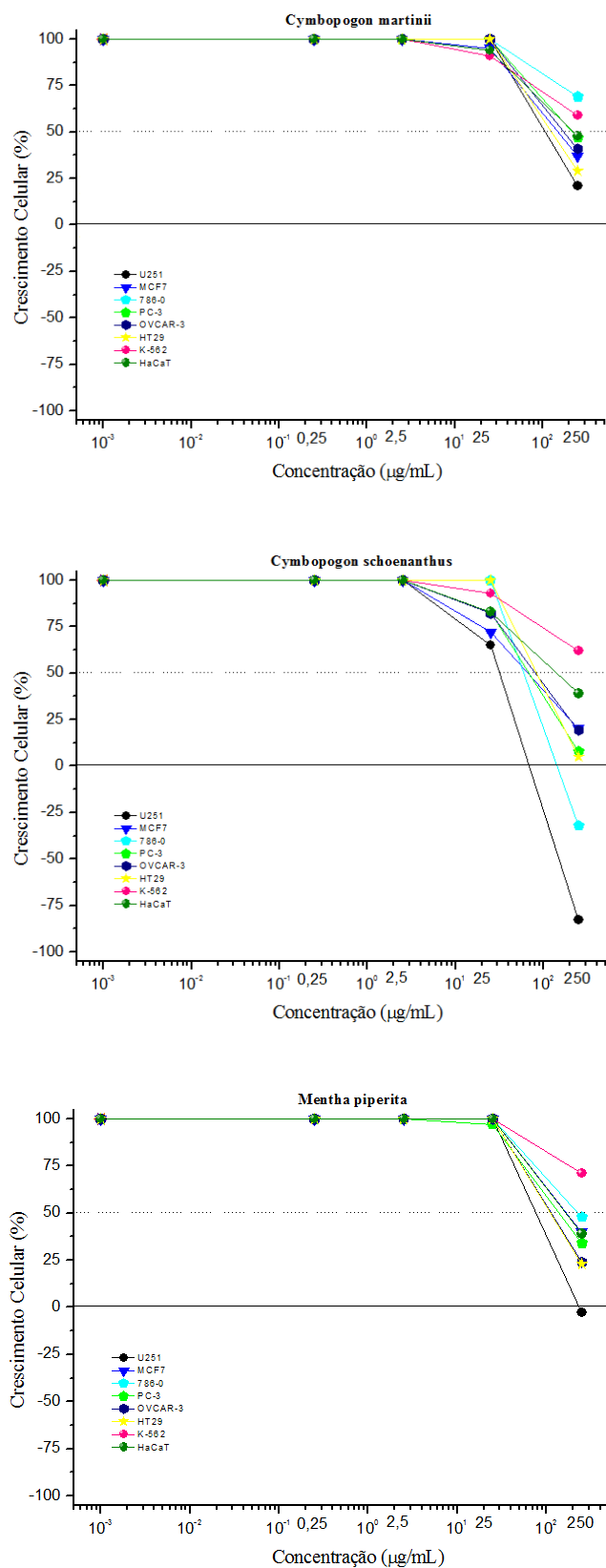


Figura 6 - Resultados dos testes de atividade antiproliferativa de *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* e *Mentha piperita* sobre células tumorais e normais humanas.

Legenda: U251 = glioma; MCF-7 = mama; 786-0 = rim; PC-3 = próstata; OVCA-3 = ovário; HT29 = colorectal; K562 = eritroleucêmica; HaCat = queratinócito humano, célula normal.

FONTE: O autor (2013)

TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* e *Mentha piperita* NECESSÁRIA PARA INIBIR 50% DE CRESCIMENTO CELULAR (GI 50 em µg/mL)

Amostra	2	m	7	p	o	h	k	q
Doxorrubicina	0,026	0,28	0,23	1,1	5,7	1,3	2,2	1,4
<i>C. martinii</i>	221,0	175,7	>250	247,3	241,5	217,2	>250	234,2
<i>C. schoenanthus</i>	25,0	64,3	37,9	61,8	81,2	193,5	>250	151,4
<i>M. piperita</i>	51,8	240,5	248,2	172,8	224,0	223,0	>250	239,6

2 = U251 (glioma, SNC); m = MCF-7 (mama); 7 = 786-0 (rim); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT29 (colorectal); k = K562 (eritroleucêmica); q = HaCat (queratinócito humano, célula normal).

FONTE: O autor (2013)

TABELA 12 - CONCENTRAÇÃO EM LOGARÍTIMO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* e *Mentha piperita* NECESSÁRIA PARA OCORRER 50% DE CRESCIMENTO CELULAR (Log GI 50)

Amostra	2	m	7	p	o	h	k	q
Doxorrubicina	-1,58	-0,55	-0,63	0,04	0,75	0,11	0,34	0,14
<i>C. martinii</i>	2,34	2,24	2,39	2,39	2,38	2,33	2,39	2,36
<i>C. schoenanthus</i>	1,39	1,80	1,57	1,79	1,90	2,28	2,39	2,18
<i>M. piperita</i>	1,71	2,38	2,39	2,23	2,35	2,34	2,39	2,37

Inativo: log GI50 > 1,50; Atividade fraca: log GI50 > 1,10; moderada: log GI50 > 0-1,10; forte: log GI50 < 0.

FONTE: O autor (2013)



TABELA 13 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* e *Mentha piperita* IDENTIFICADAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

<b><i>C. martinii</i></b>		<b><i>C. schoenanthus</i></b>		<b><i>M. piperita</i></b>	
Composto	%	Composto	%	Composto	%
Limoneno	0,3	n.i.	0,7	Alfa-pineno	0,4
Beta-Cis-Ocimeno	0,2	Linalol	1,7	Sabineno	0,3
Beta-Trans-Ocimeno	1,3	Citronelal	0,6	Beta-pipeno	0,8
Linalol	3,4	n.i.	0,3	Mirceno	0,4
Neral	0,3	Decanal	0,4	Limoneno	3,3
Geraniol	77,8	Citronelol	4,3	1,8-cineol	2,3
Geranial	1,66	Neral	8,1	Metona	17,6
Acetato de geranila	13,4	Geraniol	57,4	Mentofurano	21,8
Trans-cariofileno	0,8	Geranial	12,0	Mentol	26,8
n.i.	0,4	Formiato de geranila	0,3	Terpineol	0,9
		Acetato de citronelila	0,1	Pulegona	13,5
		Eugenol	0,3	Piperitona	1,7
		Acetado de geranila	2,7	Acetato de metila	6,3
		Elemeno	0,4	n.i.	0,5
		Cariofileno	3,7	n.i.	0,6
		Alfa-cariofileno	0,5	Cariofileno	0,7
		Germacreno	0,1	n.i.	1,3
		Muroleno	0,2		
		Gama-cadineno	0,6		
		Delta-cadineno	1,2		
		Elemol	0,6		
		Óxido de cariofileno	1,3		
		Alfa-murolol	0,5		
		Alfa-cardinol	0,7		

## 5.5 DISCUSSÃO

O princípio das metodologias de TEO e TMLA é analisar o efeito de uma substância no embrião e eclosão de ovos bem como na motilidade larvar respectivamente (D'ASSONVILLE; JANOVSky; VERSTER, 1996; MOLENTO; PRICHARD, 2001; TAYLOR; HUNT; GOODYEAR, 2002). Técnicas *in vitro* possuem vantagens pela simples execução, custo baixo e resultados rápidos em diferentes fases parasitárias, permitindo selecionar uma grande quantidade de plantas com uso de pouco material biológico (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006; HOSTE *et al.*, 2008).

Efeitos ovicidas por meio do TEO também foram relatados em *Croton zehntneri* e *Lippia sidoides* com DL 50 de 0,74 e 0,40 mg/mL, respectivamente (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007). Esses óleos apresentaram altas concentrações de anetol e timol respectivamente sendo os prováveis compostos responsáveis pelo efeito anti-helmíntico.

O óleo de *Eucalyptus staigeriana* obteve 50% de eficácia a 0,32 mg/mL e 99% a 1,35 mg/mL com limoneno e citral como os principais constituintes presentes nas concentrações de 28,82% e 24,93%, respectivamente (MACEDO *et al.*, 2010).

Um trabalho com o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* obteve doses letais maiores comparadas as do presente estudo. O óleo apresentou 50% de eficácia a 8,3 mg/mL e 99% a 21,75 mg/mL em 48h. Na análise química do óleo a quantidade de limoneno era de apenas 8,16%. Talvez o efeito anti-helmíntico possa ter ocorrido devido ao alto teor de eucaliptol (83,89%) (MACEDO *et al.*, 2009). Os autores relataram valores de eficácia maiores que os do presente estudo, provavelmente, pelo maior tempo de incubação ou pela qualidade da mistura de terpenos que compõem o óleo.

Em experimentos com a avaliação do desenvolvimento de larvas, *Croton zehntneri*, *Lippia sidoides*, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus staigeriana* obtiveram 50% de eficácia em concentrações de 1,37; 2,97; 6,92 e 1,70 mg/mL, respectivamente (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2009, 2010). As concentrações capazes de inibir 99% do desenvolvimento larvar em *E. globulus* e *E. staigeriana* foram de 43,50 e 5,40 mg/mL respectivamente (MACEDO

*et al.*, 2009, 2010). Esses resultados demonstram possível sensibilidade de larvas L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> aos terpenos. Porém não houve relatos de testes em larvas L<sub>3</sub>.

Os óleos essenciais do presente estudo, não obtiveram eficácia superior a 90% pelo TMLA. Talvez maiores concentrações pudessem alcançar esse resultado, porém seria necessário um aumento na quantidade de solvente o que poderia interferir nos resultados pela sensibilidade dos parasitas a essas substâncias e em estudos *in vivo* ser tóxica ao animal, bem como causar contaminação ambiental (CARVALHO *et al.*, 2012; CHAGAS *et al.*, 2012).

O óleo essencial de *Cymbopogon martinii* apresentou atividade ovicida superior aos demais óleos testados, diferentemente do trabalho desenvolvido por Katiki *et al.* (2011) com as mesmas espécies vegetais, porém utilizando nematódeos de ovinos. Os autores observaram maior eficácia em *Cymbopogon schoenanthus* obtendo 50% de inibição da eclosão de ovos a 0,04 mg/mL e 99% a 0,27 mg/mL. A mesma espécie possuiu valores mais elevados de DL 50 (0,26 mg/mL) e DL 99 (1,43 mg/mL) em nosso estudo. Além disso, o trabalho acima citado apresentou eficácia de *C. martinii* também superior à obtida nesse trabalho. A diferença entre os teores de geraniol dos dois trabalhos foi de 3,6% para *C. martinii* e 5,1% para *C. schoenanthus*. Sugere-se que a diferença na qualidade dos óleos pode provocar um efeito sinérgico ou antagônico entre os terpenos. Alguns componentes identificados nas análises de Katiki *et al.* (2011) não foram identificados neste trabalho.

Em relação ao óleo de *Mentha piperita*, Katiki *et al.* (2011) obtiveram melhor resultado. Isso pode ser explicado devido ao maior teor de mentol (42,5%) identificado no trabalho citado.

Carvalho *et al.* (2012) estudaram o efeito de *Mentha piperita* sobre *Haemonchus contortus* obtendo 50% de inibição da eclodibilidade de ovos a 0,037 mg/mL e 90% a 0,10 mg/mL. Esses resultados foram mais promissores comparados a este estudo e essa diferença pode ser explicada pela quantidade de terpenos. Uma vez que os autores obtiveram 12 compostos a mais pela CG/MS. Sugere-se que essa maior quantidade de compostos pode ter resultado na alta eficácia. Outras hipóteses seriam a volatilização de terpenos ocorrida no presente estudo bem como a diferença de susceptibilidade entre espécies de nematódeos. Porém novos estudos devem ser realizados para confirmar essas hipóteses.

Até o presente momento não há relatos de atividades de óleos essenciais sobre motilidade de larvas L<sub>3</sub>, porém, em L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> por meio do teste de

desenvolvimento larvar (TDL) (HUBERT; KERBOEUF, 1992). Katiki *et al.* (2011) encontraram 50% de eficácia a 0,15; 0,06 e 0,26 mg/mL e 99% a 0,35; 0,27; 0,91 mg/mL para *Cymbopogon martinii*, *C. schoenanthus* e *Mentha piperita* respectivamente. Carvalho *et al.* (2012) obtiveram uma DL 50 de 0,018 e DL 90 de 0,03 mg/mL para *M. piperita* também utilizando o TDL. No presente trabalho, o TMLA obteve somente 50% de eficácia em concentrações mais elevadas.

As diferenças observadas entre valores podem ser explicadas pelo grande número de protocolos existentes sobre colheita e estocagem de material vegetal. Dessa forma, plantas podem ser colhidas e estocadas de diversas maneiras resultando em mudanças na composição e no efeito biológico. Variações ambientais e de estações do ano afetam propriedades físicas e químicas vegetais (MUELLER-HARVEY; MCALLAN, 1992; ATHANASIADOU; GITHIORI; KYRIAZAKIS, 2007). Outro fator é a variabilidade genética entre plantas que pode afetar sua composição (CROOM, 1983). Os estudos também diferem na metodologia utilizada. O TDL avalia a evolução de larvas L<sub>1</sub> (ou ovos) para L<sub>3</sub>. Katiki *et al.* (2011) e Carvalho *et al.* (2012) obtiveram DL 50 menor comparada ao nosso estudo o que pode-se suspeitar de que as larvas L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> possam ser mais sensíveis aos extratos vegetais do que as L<sub>3</sub>. Para a avaliação da eclosão de ovos, os estudos acima citados utilizaram o TEO também obtendo diferença entre valores. É reconhecido que laboratórios podem obter resultados diferentes entre si e isso pode ocorrer devido a diferentes tipos de água utilizados (destilada, deionizada ou água de torneira) e a quantidade de sujidades de uma solução contendo ovos ou larvas (COLES *et al.*, 2006). A estação do ano e o horário de colheita podem influenciar a qualidade e a quantidade de substâncias ativas, pois estas não são constantes no decorrer do ano (GOBBONETO; LOPES, 2007). Esse fato foi observado por Roca-Pérez *et al.* (2004) onde folhas de *Digitalis obscura* apresentaram baixas concentrações de cardenolídeos no período da primavera. No verão essas concentrações aumentaram bruscamente e no outono houve um novo decréscimo.

O acetato de geranila é um composto o qual é transformado em geraniol pela ação da enzima esterase (DUNBERY; LUTHRA, 2001). Estudos têm relatado efeito bioativo do geraniol em *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (BARD *et al.*, 1988; MARUYAMA *et al.*, 2008), *Caenorhabditis elegans* (KUMARAN *et al.*, 2003) e *Salmonella typhimurium* (KIM, J. M. *et al.*, 2006). Há também solicitação de patente envolvendo o tratamento de doenças virais em humanos e animais (COPPENS,

2011) e relatos de atividade repelente (MÜLLER *et al.*, 2009) e anticancerígena (YU; HILDEBRANT; ELSON, 1995; BURKE *et al.*, 1997; KIM, S. H. *et al.*, 2012). Carnesecchi *et al.* (2001) estudaram o efeito do geraniol em células de câncer de colon humanas. Segundo os autores, houve uma inibição de 70% do crescimento celular com 400 µM de geraniol onde foi observado um acúmulo de células na fase S do ciclo celular com consequente inibição da síntese de DNA. O composto também causou um decréscimo de 50% na ação da enzima ornitina-descarboxilase responsável pela síntese de poliaminas as quais regulam o crescimento, diferenciação e desenvolvimento celular. Essas informações sugerem que o geraniol pode ter afetado a embriogênese e o desenvolvimento dos ovos de helmintos.

Hierro *et al.* (2004) estudaram o efeito de monoterpenos em larvas L<sub>3</sub> do nematódeo *Anisakis simplex* e observaram que a concentração de 12,50 µg/mL de geraniol causou lesões no tubo digestivo e na cutícula larvar. Esses danos podem sugerir o efeito larvicida nos estudos que utilizaram o TDL em que a substância pode ter afetado a alimentação de L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> com consequente interrupção no desenvolvimento larvar.

A atividade larvicida no TMLA no presente estudo pode ser explicada pelo efeito neuronal reportado por Sadraei, Asghari e Emami (2013). Os autores testaram o efeito de *Rosa damascena* na contração muscular no íleo de ratos. O geraniol obteve uma ação dose-dependente na inibição da contratilidade muscular a 3,2 µg/mL induzida por cloreto de potássio (KCl), sugerindo efeito pós-sináptico pela inativação de K. Talvez, os óleos de *Cymbopogon martinii* e *C. schoenanthus* induzam à paralisia em concentrações mais elevadas como no caso do presente estudo.

Geranial e neral são isômeros onde sua mistura é conhecida como citral (WOHLMUTH *et al.*, 2006) a qual existem estudos demonstrando efeito contra *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (FRIEDMAN *et al.*, 2004), *Anisakis simplex* (HIERRO; VALERO; NAVARRO, 2006), *Trypanosoma cruzi* (CARDOSO, J.; SOARES, 2010), *Tetranychus urticae* (LIM *et al.*, 2011) e *Leishmania sp.* (MACHADO *et al.*, 2012).

O citral pode afetar a embriogênese de ovos de nematódeos gastrintestinais pela inibição da formação de larvas jovens. Chaouki *et al.* (2009) observaram a ação do citral na inibição do crescimento de células de câncer de mama 24h após o tratamento, onde o composto causou uma interrupção na fase G<sub>2</sub> do ciclo celular.

Sugere-se então que o citral presente em *Cymbopogon schoenanthus* possua um efeito adicional na atividade ovicida obtida no presente estudo.

Hierro *et al.* (2006) observaram que o citral em contato com L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* obteve melhor efeito larvicida do que outros terpenos. Com esse achado supõe-se que o citral possa ser o responsável pela eficácia mais promissora de *C. schoenanthus* em L<sub>3</sub> como observado em nosso trabalho.

O mentol possui relatos com propriedade analgésica (GALEOTTI *et al.*, 2002) bem como bioativa contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (NOVELINO; DAEMON; SOARES, 2007) e *Staphylococcus aureus* (QIU *et al.*, 2011).

O efeito ovicida de *Mentha piperita* pode ter ocorrido devido uma alteração na membrana dos ovos dos helmintos o que pode ser explicado pelo trabalho de Trombeta *et al.* (2005). Os autores sugeriram que o efeito antibacteriano de mentol contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi devido às alterações na permeabilidade da membrana plasmática celular além de penetrar e interagir no meio intracelular causando essa atividade. Esse composto é lipofílico e consequentemente interage com os lipídios da membrana.

No caso do efeito larvicida, o contato com óleo essencial pode ter resultado em paralisia das L<sub>3</sub>. Essa atividade é sugerida baseando-se no estudo realizado por Badawy, El-Arami e Abdelgaleil (2010) onde testes com terpenos em *Tetranicus urticae* resultaram na inibição de 66,6% da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE), a qual é responsável pelo funcionamento do sistema neuromuscular. Se a AChE for inibida, as funções neuromusculares tornam-se comprometidas.

A partir desses estudos, é possível suspeitar de que essas substâncias sejam as responsáveis pelo efeito anti-helmíntico do presente trabalho. Sugere-se o estudo dessas substâncias isoladamente. Ntalli *et al.* (2010) estudaram o efeito isolado de terpenos, dentre eles o geraniol e o timol, contra o nematódeo *Meloidogyne incognita* e concluíram que esses compostos foram mais ativos individualmente do que misturados em óleos essenciais, sugerindo um efeito antagônico entre componentes de um mesmo extrato vegetal. Portanto, testes com geraniol, citral e mentol podem oferecer resultados mais confiáveis do efeito desses compostos. *C. martinii* pode ter obtido melhor efeito no TEO pelo maior teor de geraniol comparado às outras amostras. Porém, o resultado pode ser mais promissor se essa substância for testada isoladamente como comprovado por Kumaran *et al.* (2003) onde os

autores observaram uma DL 50 de 66,7 µg/mL para o geraniol e 125,4 µg/mL para o *C. martinii* contra *Caenorhabditis elegans*. Esse resultado pode comprovar o efeito antagônico que o geraniol pode sofrer estando junto com outros compostos em um mesmo óleo.

Os testes *in vitro* são, principalmente, utilizados para a seleção de extratos de plantas sem experimentação *in vivo* simultaneamente. Embora esses estudos ofereçam essa seleção de extratos vegetais em larga escala com atividade nematicida, experimentos *in vivo* nem sempre apresentam esse mesmo efeito tornando questionável a relação entre essas duas metodologias (ATHANASIADOU; KYRIAZAKIS, 2004). Katiki *et al.* (2011) testaram o óleo de *Cymbopogon schoenanthus* em ovinos experimentalmente infectados com *Haemonchus contortus*. Os resultados *in vitro* pelo LDT foram promissores, porém o mesmo não foi observado *in vivo*. Dessa forma, para comprovar a eficácia de *C. martinii*, *C. schoenanthus* e *M. piperita*, testes *in vivo* devem ser realizados. Porém deve-se ter atenção quanto a possíveis efeitos tóxicos em animais (WALLER *et al.*, 2001). Ensaios de toxicidade são necessários para a determinação de efeitos e da margem de segurança de extratos vegetais em organismos vivos (MACEDO *et al.*, 2009).

No teste de toxicidade em células, a porcentagem de crescimento é analisada por espectrofotometria da absorbância de proteínas coradas com SRB. Esse método avalia se uma amostra interrompe o crescimento sem provocar morte celular (citostática) ou provoca morte celular (citocida) (SHOEMAKER, 2006). Os três óleos essenciais apresentaram fraca atividade comparados à doxorrubicina, sugerindo ausência de sinergismo entre os componentes do óleo essencial. A linhagem celular não tumoral (HaCat) não foi afetada pelas amostras testadas sugerindo haver uma seletividade de ação anti-helmíntica no presente estudo bem como de outras atividades biológicas com as mesmas espécies discutidas anteriormente e demonstrando possível segurança no uso em mamíferos. Essa mesma metodologia foi utilizada por Itharat *et al.* (2004) para pesquisas com plantas medicinais contra células de carcinoma pulmonar, adenocarcinoma mamário e adenocarcinoma de colon humano. Os autores observaram efeito promissor de plantas em células tumorais, porém para células normais houve baixa citotoxicidade. Entretanto, testes de toxicidade em cobaias devem ainda ser utilizados juntamente com avaliação bioquímica, devido a relatos de efeitos tóxicos em fígado e rins pelo uso de produtos fitoterápicos (BAGNIS *et al.*, 2004; COLSON; DE BROE, 2005; KOSIF *et al.*, 2010).

## 5.6 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* e *Mentha piperita* apresentaram efeito na inibição da eclodibilidade de ovos e da motilidade de larvas sendo potenciais candidatos para utilização no controle de nematódeos gastrintestinais de bovinos.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para que a produção pecuária no Brasil continue sendo uma atividade promissora, medidas são necessárias para isso continuar em ascensão. O controle sanitário é de responsabilidade do médico veterinário o qual deve estar atualizado quanto às mudanças que ocorrem em metodologias de prevenção, diagnóstico e tratamento de enfermidades.

Em relação às doenças parasitárias, é de extrema importância se obter uma boa relação entre o profissional, funcionários e proprietários de um sistema de produção onde os mesmos devem discutir sobre o que se deseja fazer e como isso irá ocorrer. É dever dos médicos veterinários orientar membros de uma equipe de trabalho em como controlar as endoparasitoses sem o uso intensivo de drogas sintéticas.

O surgimento da resistência é inevitável e, portanto, os proprietários e demais funcionários devem ser conscientizados de que cura clínica não é sinonímia de cura parasitária, podendo o animal conviver com certa carga de parasitas sem que haja um comprometimento relevante no desempenho e saúde do animal. As drogas anti-helmínticas não eliminam os parasitas completamente, isto é, sempre haverá uma quantidade mínima de helmintos homozigoto-resistentes mesmo após o tratamento. Porém essa quantidade ainda causará pouco ou nenhum impacto na produção.

As novas alternativas de controle parasitário dentre elas fungos, vacinas, bactérias ou plantas, ainda carecem de mais estudos. Testes *in vitro* possuem extrema importância para a seleção de plantas e outros produtos com suspeita de bioatividade contra helmintos, reduzindo o uso de animais na experimentação. Porém, resultados altamente promissores podem não refletir na mesma eficácia quando se testa o produto *in vivo*, pois não se sabe ainda como esse composto poderá se comportar em um organismo. Além disso, deve-se atentar para possíveis efeitos nocivos que uma substância desconhecida pode desencadear. Por isso, os testes de toxicidade são úteis para se estudar a margem de segurança.

Extratos vegetais estão sendo cada vez mais estudados para o desenvolvimento de novas drogas. As pesquisas com esses derivados de plantas crescem com o objetivo de se obter tratamentos mais eficazes de enfermidades. Alguns medicamentos utilizados em larga escala tanto na medicina como na

medicina veterinária foram produzidos por meio de estudos com plantas como é o caso da espécie *Catharanthus roseus* popularmente conhecida como vinca a qual deu origem aos quimioterápicos vincristina e vimblastina. Da mesma forma, a *Digitalis purpurea* conhecida como dedaleira ou campainha, deu origem à digoxina a qual é utilizada em tratamentos de insuficiência cardíaca.

Em relação aos nematódeos gastrintestinais, os testes *in vitro* demonstram resultados animadores. Porém, o objetivo ainda não é desenvolver uma droga única provinda de plantas, e sim atuar em conjunto com um composto sintético da mesma forma como ocorre com alguns inseticidas comercializados atualmente no mercado.

Ainda é necessário um estudo detalhado do mecanismo de ação dos compostos bioativos vegetais e posteriormente escolher a forma farmacêutica correta para administração em um experimento *in vivo* para uma melhor atuação da atividade medicinal das plantas.

Vale ainda ressaltar que o processo de análises laboratoriais é apenas o primeiro passo para se obter um produto eficaz. Outros procedimentos devem ser realizados até o produto chegar ao comércio.

A partir dos experimentos realizados neste estudo os óleos testados parecem ter um futuro promissor. Entretanto, não é possível dizer qual foi o melhor extrato, independente dos valores de eficácia obtidos, pois não foram testados na mesma época e provavelmente não foram colhidos da mesma maneira. Para obter esse tipo de resposta, deve-se acompanhar criteriosamente o processo de colheita, estocagem e extração dos óleos e, preferencialmente, os mesmos devem receber esse tipo de tratamento na mesma época e horário, para posteriormente testá-los nas mesmas condições em laboratório.

Espera-se que os estudos com plantas em parasitas de bovinos sejam crescentes, assim como ocorre com ovinos e caprinos e que esses estudos tragam melhorias para a saúde animal bem como para o futuro da pecuária brasileira.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, K. *et al.* Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 5, p. 1739-1745, 1998.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ADJRAH, Y. *et al.* Efficacy of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (Poaceae) extracts on diamondback moth damaging cabbage. **Journal of Biofertilizers and Biopesticides**, Los Angeles, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2012.
- AL-ROFAAI, A. *et al.* *In vitro* activity of neem (*Azadirachta indica*) and cassava (*Manihot esculenta*) on three pre-parasitic stages of susceptible and resistant strains of *Teladorsagia* (*Ostertagia*) *circumcincta*. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v. 188, n. 1-2, p. 85-92, 2012.
- ALI, A. M. *et al.* Antiviral and cytotoxic activities of some plants used in Malaysian indigenous medicine. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, Serdang, v. 19, n. 2-3, p. 129-136, 1996.
- ALMEIDA, R. B. A. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf sobre *Candida spp.* **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 37, n. 2, p. 147-153, 2008.
- ALMEIDA, G. D. *et al.* Ivermectin and moxidectin resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of *Cooperia spp.* in beef cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 191, n. 1-2, p. 59-65, 2013.
- ANSARIA, M. A. *et al.* Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. **Bioresource Technology**, Nova Iorque, v. 71, n. 3, p. 267-271, 2000.
- ANZIANI, O. S. *et al.* Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 303-306, 2004.

ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 462–468, 2005.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. **Proceedings of the Nutrition Society**, Londres, v. 63, n. 4, p. 631-639, 2004.

ATHANASIADOU, S.; GITHIORI, J.; KYRIAZAKIS, I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. **Animal**, Cambridge, v. 1, n. 9, p. 1392-1400, 2007.

BADAWY, M. E.; EL-ARAMI, S. A.; ABDELGALEIL, S. A. Acaricidal and quantitative structure activity relationship of monoterpenes against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 52, n. 3, p. 261-274, 2010.

BAGNIS, C. I. *et al.* Herbs and the kidney. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2004.

BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, Dubai, v. 3, n. 2, p. 81-88, 2008.

BARD, M. *et al.* Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, Chicago, v. 23, n. 6, p. 534-538, 1988.

BASSETO, C. C. *et al.* Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 377-381, 2011.

BENTOUNSI, B.; KHAZNADAR, A.; CABARET, J. Resistance of *Trichostrongylus* spp. (Nematoda) to benzimidazole in Algerian cattle herds grazed with sheep. **Parasitology Research**, Berlin, v. 110, n. 2, p. 1021-1023, 2012.

BILLERBECK, V. G. *et al.* Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 1, p. 9-17, 2001.

BIZIMENYERA, E. S. *et al.* *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 3-4, p. 336–343, 2006.

BLANK, A. F. *et al.* Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.

BORGES, F. A. *et al.* Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25% ivermectin + 1.25% abamectin in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, n. 3-4, p. 299-307, 2008.

BRICARELLO, P. A. *et al.* Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 272-278, 2007.

BURKE, T. D. *et al.* Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. **Lipids**, Chicago, v. 32, n. 2, p. 151-156, 1997.

BUSKE, R. *et al.* *In vitro* influence of temperature on the biological control activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* in sheep. **Parasitology Research**, Berlim, v. 112, n. 2, p. 473-478, 2012.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. *et al.* Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 97-106. 2005.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. *et al.* Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 288-294, 2007.

CANUL-KU, H. L. *et al.* Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 292-298, 2012.

CARDOSO, J.; SOARES, M. J. *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 8, p. 1026-1032, 2010.

CARDOSO, J. M. S. *et al.* Identification of ivermectin and doramectin-resistant *Cooperia punctata* (LINSTOW, 1907) in a dairy herd in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, suplemento, p. 75-81, 2008.

CARNESECCHI, S. *et al.* Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 298, n. 1, p. 197-200, 2001.

CARVALHO, C. O. *et al.* The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 260-268, 2012.

CEZAR, A. S. *et al.* Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 7, p. 523-528, 2010.

CHAGAS A. C. S. *et al.* *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 1, p. 295-303, 2012.

CHAOUKI, W. *et al.* Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 549-556, 2009.

COLES, G. C. *et al.* W.A.A.V.P. methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992.

COLES, G. C.; STAFFORD, K. A.; MACKAY, P. H. S. Ivermectin-resistant *Cooperia* species from calves on a farm in Somerset. **Veterinary Record**, Londres, v. 142, n. 10, p. 255-256, 1998.

COLES, G. C. *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, n. 3-4, p. 167-185, 2006.

COLSON, R. D.; DE BROE, M. E. Kidney injury from alternative medicines. **Advances in Chronic Kidney Disease**, Philadelphia, v. 12, n. 3, p. 261-275, 2005.

CONDI, G. K.; SOUTELLO, R. G. V.; AMARANTE, A. F. T. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 161, n. 3-4, p. 213-217, 2009.

CONWAY, D. P. Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 25, p. 106-107, 1964.

COPPENS, C. **Antiviral compositions comprising geraniol and carvone**, EP2368547, 2011.

COSTA, M. S. V. L. F. *et al.* Anthelmintic resistance in a dairy cattle farm in the state of Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2011.

CROOM, E. M. Documenting and evaluating herbal remedies. **Economic Botany**, Bronx, v. 37, n. 1, p. 13-27, 1983.

D'ASSONVILLE, J. A.; JANOVSKY, E.; VERSTER A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 61, n. 1-2, p. 73-80, 1996.

DEMELER, J. *et al.* Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 109-115, 2009.

DEMELER, J. *et al.* Evaluation of the egg hatch assay and the larval migration inhibition assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 61, n. 4, p. 614-618, 2012.

DRUDGE, J. H. *et al.* Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 25, p. 1512-1518, 1964.

DUARTE, M. C. T. *et al.* Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUBEY, V. S.; LUTHRA, R. Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. *motia*) inflorescence development. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 675-680, 2001.

DZAMIC, A. M. *et al.* Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. **Botanica Serbica**, Belgrade, v. 34, n. 1, p. 57-61, 2010.

EAGLESON J. S.; BOWIE J. Y. Oxfendazole resistance in *Trichostrongylus axei* in cattle in Australia. **Veterinary Record**, Londres, v. 119, n. 24, p. 604, 1986.

ERLER, F.; ULUG, I.; YALCINKAYA, B. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. **Fitoterapia**, Milano, v. 77, n. 7-8, p. 491-494, 2006.

FIEL, C. A. *et al.* Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 211-217, 2001.

FIGUEIRINHA, A. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols. **Journal of Medical Food**, Larchmont, v. 13, n. 3, p. 681-690, 2010.

FRED-JAIYESIMI, A. A.; ADEPOJU, A.; EGBEBUNNI, O. Anthelmintic activities of chloroform and methanol extracts of *Buchholzia coriacea* Engler seed. **Parasitology Research**, Berlim, v. 109, n. 2, p. 441-444, 2011.

FRIEDMAN, M. *et al.* Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 19, p. 6042-6048, 2004.

GALEOTTI, N. *et al.* Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 322, n. 3, p. 145-148, 2002.

GANJEWALA, D.; LUTHRA, R. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 5, n. 1, p. 163-172, 2010.



GASBARRE, C. L. *et al.* The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 3-4, p. 281-285, 2009.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminthes in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 213-228, 1997.

HIERRO, I. *et al.* Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L<sub>3</sub> larvae. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 11, n. 1, p. 77-82, 2004.

HIERRO, I.; VALERO, A.; NAVARRO, M. C. *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 13, n. 7, p. 527-531, 2006.

HÖFLING, J. F. *et al.* Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 1065-1068, 2010.

HOSTE, H. *et al.* Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. **Tropical Biomedicine**, Kuala Lumpur, v. 25, n. 1 (suplemento), p. 56-72, 2008.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, Londres, v. 130, n. 20, p. 442-446, 1992.

ITHARAT, A. *et al.* *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 90, n. 1, p. 33-38, 2004.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 477-481, 2004.

KATIKI, L. M. *et al.* Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 1-2, p. 103-108, 2011.

KETOH, G. K.; KOUMAGLO, H. K.; GLITHO, I. A. Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (Poaceae), and the wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 363-371, 2005.

KETOH, G. K. *et al.* Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. **Fitoterapia**, Milano, v. 77, n. 7-8, p. 506-510, 2006.

KHADRI, A. *et al.* Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and <sup>13</sup>C NMR. **Food Chemistry**, Barking, v. 109, n. 3, p. 630-637, 2008.

KHADHRI, A. *et al.* Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. **LWT – Food Science and Technology**, Londres, v. 43, n. 2, p. 331-336, 2010.

KHADHRI, A.; MOKNI, R. E. I.; ARAÚJO, M. E. M. Screening of the antimicrobial properties of the essential oils of *Cymbopogon schoenanthus*. **Tropical Journal of Medicinal Research**, Nnewi, v. 15, n. 2, p. 32-34, 2011.

KIM, J. M. *et al.* Antibacterial activity of carvacol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 6, p. 1364-1368, 1995.

KIM, S. H. *et al.* Geraniol induces cooperative interaction of apoptosis and autophagy to elicit cell death in PC-3 prostate cancer cells. **International Journal of Oncology**, Atenas, v. 40, n. 5, p. 1683-1690, 2012.

KOSIF, R. *et al.* Histopatological effects of *Aloe barbadensis* and soybean oil on rat liver. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 24, n. 4, p. 1101-1106, 2010.

KUMAR, P. *et al.* Repellent, larvicidal and pupicidal properties of essential oils and their formulations against the housefly, *Musca domestica*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 302-310, 2011.

KUMAR, S.; WAHAB, N.; WARIKOO, R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Pequim, v. 1, n. 2, p. 85-88, 2011.

KUMARAN, A. M. *et al.* Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 17, n. 8, p. 957, 2003.

LANGE, B.; CROTEAU, R. Genetic engineering of essential oil production in mint. **Current Opinion in Plant Biology**, Londres, v. 2, n. 2, p. 139-144, 1999.

LIFSCHITZ, A. *et al.* Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: Comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 172–178, 2010.

LIM, E. G. *et al.* Temperature-dependent fumigant activity of essential oils against twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 104, n. 2, p. 414-419, 2011.

LYNDAL-MURPHY, M. *et al.* Reduced efficacy of macrocyclic lactone treatments in controlling gastrointestinal nematode infections of weaner dairy calves in subtropical eastern Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 168, n. 1-2, p. 146-150, 2010.

MACEDO, I. T. F. *et al.* Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009.

MACEDO, I. T. F. *et al.* Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 1-2, p. 93-98, 2010.

MACEDO, I. T. F. *et al.* *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, n. 3-4, p. 504-509, 2012.

MACHADO, M. *et al.*. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 130, n. 3, p. 223-231, 2012.

MAGGIORE, M. A. *et al.* Anthelmintic effect of *Mentha spp.* essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 3, p. 1103-1112, 2012.

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 2, p. 325-327, 2008.

MARUYAMA, N. *et al.* Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 31, n. 8, p. 1501-1506, 2008.

MELLO, M. H. A. *et al.* Resistência lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 8-12, 2006.

MIMICA-DUKIC, N. *et al.*, Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 5, p. 413-419, 2003.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 117-121, 2001.

MONKS, A. *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MOREY, R. A.; KHANDAGLE, A. J. Bioefficacy of essential oils of medicinal plants against housefly, *Musca domestica* L. **Parasitology Research**, Berlim, v. 111, n. 4, p. 1799-1805, 2012.

MÜLLER, G. C. *et al.* Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, Hoboken, v. 34, n. 1, p. 2-8, 2009.

MUELLER-HARVEY, I.; MCALLAN, A. B. Tannins: their biochemistry and nutritional properties, **Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology**, Londres, v. 1, n. 1, p. 151-217, 1992.

NYAMADOR, W. S. *et al.* Variation in the susceptibility of two *Callosobruchus* species to essential oils. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 48-49, 2010.

NOGUEIRA, F. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. **Parasitology Research**, Berlim, v. 111, n. 1, p. 325-330, 2012.

NOLKEMPER, S. *et al.* Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 72, n. 15, p. 1378-1382, 2006.

NOVELINO, A. M. S.; DAEMON, E.; SOARES, G. L. G. Avaliação da atividade repelente do timol, mentol, salicilato de metila e ácido salicílico sobre larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 700-704, 2007.

NOVOBILSKÝ, A.; MUELLER-HARVEY, I.; THAMSBORG, S. M. Condensed tannins act against cattle nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, n. 2-4, p. 213-220, 2011.

NTALLI, N. G. *et al.* Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 13, p. 7856-7863, 2010.

OUMZIL, H. *et al.* Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 16, n. 8, p. 727-731, 2002.

PAPACHRISTOS, D. P.; STAMAPOULOS, D. C. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 117-128, 2002.

PARANAGAMA, P. A. *et al.* Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 86-90, 2003.

PAVELA, R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, n. 7-8, p. 691-696, 2005.

PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). **Phytotherapy Research**, Londres, v. 22, n. 2, p. 274-278, 2008.

PHASOMKUSOLSIL, S.; SOONWERA, M. Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* (Linn. ), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Pequim, v. 1, n. 1, suplemento, p. s113-s118, 2011.

PIEDRAFITA, D. P. *et al.* Field vaccination of sheep with larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, confers significant protection against na experimental challenge infection. **Vaccine**, Amsterdam, v. 30, n. 50, p. 7199-7204, 2012.

PRASAD, C. S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martinii* and *Chenopodium ambrsioides* and their synergism against dermatophytes. **Mycoses**, Berlim, v. 53, n. 2, p. 123-129, 2009.

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 54, n. 1-3, p. 259-268, 1994.

QIU, J. *et al.* Menthol diminishes *Staphylococcus aureus* virulence-associated extracellular proteins expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 90, n. 2, p. 705-712, 2011.

RANGEL, V. B. *et al.* Resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. às avermectinas em bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p. 186-190, 2005.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Research**, Victoria, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.

ROCA-PÉREZ, L. *et al.* Seasonal cardenolide production and Dop5betar gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, Londres, v. 65, n. 13, p. 1869-1878, 2004.

SADRAEI, H.; ASGHARI, G.; EMAMI, S. Inhibitory effect of *Rosa damascena* Mill flower essential oil, geraniol and citronellol on rat ileum contraction. **Research in Pharmaceutical Sciences**, Isfahan, v. 8, n. 1, p. 17-23, 2013.

SARGISON, N.; WILSON, D.; SCOTT, P. Relative inefficacy of pour-on macrocyclic lactone anthelmintic treatments against *Cooperia* species in Highland calves. **Veterinary Record**, Londres, v. 164, n. 19, p. 603-604, 2009.

SCHUCK, V. J. A. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 45-49, 2001.

SCHUHMACHER, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex vírus type 1 and type 2 *in vitro*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, n. 6, p. 504-510, 2003.

SHAH, G. *et al.* Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, Mumbai, v. 2, n. 1, p. 3-8, 2011.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews. Cancer**, Londres, v. 6, n. 10, p. 813-823, 2006.

SIEVERS, G.; FUENTEALBA, C. Comparación de la efectividad antihelmíntica de seis productos comerciales que contienen lactonas macrocíclicas frente a nemátodos gastrointestinales del bovino. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 35, n. 1, p. 81-88, 2003.

SILVA, M. R. *et al.* Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlim, v. 381, n. 5, p. 415-426, 2010.

SINGH, B. R. *et al.* Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin. **International Research of Pharmacy and Pharmacology**, Sapele, v. 1, n. 9, p. 228-236, 2011.

SOCOVIĆ, M. D. Antifungal activity of the essential of *Mentha piperita*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 44, n. 7, p. 511-515, 2006.

SOKOVIĆ, M. D. *et al.* Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 1, p. 238-249, 2009.

SOUTELLO, R. G. V.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 360-364, 2007.

SOUZA, A. P. *et al.* Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1363-1367, 2008.

STROMBERG, B. E. *et al.* *Cooperia punctata*: Effect on cattle productivity? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, n. 3-4, p. 284-291, 2012.

SUAREZ, V. H.; CRISTEL, S. L. Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 111-117, 2007.

TCHOUMBOUGNANG, F. *et al.* *In vivo* antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 71, n. 1, p. 20-23, 2005.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 205-210, 2010.

TOLOZA, A. C. *et al.* Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 43, n. 5, p. 889-895, 2006.



TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 77, n. 2–3, p. 159–173, 2008.

TRABOULSI, A. *et al.* Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 58, n. 5, p. 491-495, 2002.

TROMBETTA, D. *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2472-2478, 2005.

VERMUNT, J. J.; WEST, D. M.; POMROY, W. E. Multiple resistance to ivermectin and oxfendazole in *Cooperia* species of cattle in New Zealand. **Veterinary Record**, Londres, v. 137, n. 2, p. 43-45, 1995.

WAGHORN, T. S. *et al.* Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 54, n. 6, p. 278-282, 2006.

WALLER, P. J. *et al.* Plants as de-worming agents of livestock in the nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 42, n. 1, p. 31-44, 2001.

WANG, J.; WANG, R.; YANG, X. Y. Efficacy of na *Arthrobotrys oligospora* N mutant in nematode trapping larvae after passage through the digestive tract of sheep. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 161, n. 3-4, p. 359-361, 2013.

WOHLMUTH, H. Essential oil composition of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) grown in Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 4, p. 1414-1419, 2006.

YANG, P.; MA, Y. Repellent effect of plant essential oils against *Aedes albopictus*. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 30, n. 2, p. 231-234, 2005.

YU, S. G.; HILDEBRANT, L. A.; ELSON, C. E. Geraniol, na inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 125, n. 11, p. 2763-2767, 1995.

## VITA

Fernando Staude Kloster é médico veterinário graduado pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná em 2009 e especialista em Biotecnologia pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná em 2010. Possui experiência na área de Medicina Veterinária, com ênfase em helmintologia, análise de extratos vegetais com suspeita anti-helmíntica, microbiologia, doenças parasitárias, doenças infecciosas, saúde pública, zoonoses, epidemiologia, diagnóstico e controle da raiva e da encefalopatia espongiforme bovina.

Durante a graduação realizou estágio no período compreendido entre 2004 e 2007 na Unidade Hospitalar para Animais de Fazenda da Pontifícia Universidade Católica do Paraná atuando na área de clínica médica de ruminantes. Em 2008 realizou estágio na Secretaria de Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná (SEAB) no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti atuando no diagnóstico laboratorial da raiva, anemia infecciosa equina e doença de Aujeszky.

Em 2009 e 2010 foi pesquisador de desenvolvimento tecnológico industrial nível três do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná.

## **ANEXOS**

## **PROTOCOLO DE RECUPERAÇÃO DE OVOS DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS**

- Coletar fezes do reto de animais infectados que apresentem OPG acima de 2000 ovos
- Pegar uma porção das fezes, macerar e acrescentar água aquecida;
- Filtrar o material fecal em quatro peneiras com as seguintes reticulações: 1mm, 105µm, 55µm e 25µm;
- Lavar a peneira de 25µm com água destilada, com auxílio de pisseta, para retirar os ovos que ficaram retidos;
- Colocar este conteúdo em um Béquer e posteriormente transferi-lo para tubos Falcon;
- Colocar os tubos Falcon em centrífuga por 5 min a 3000 rpm;
- Após a centrifugação, descartar o sobrenadante, completar com solução salina saturada para a ressuspensão do sedimento;
- Centrifugar por 5 min a 3000 rpm;
- Após a centrifugação, despejar o sobrenadante na peneira de 25 µm e lavar com água destilada (Caso a suspensão fique suja, repetir a centrifugação com solução salina saturada);
- Despejar o conteúdo da peneira em um cálice de decantação (1h); deixar a temperatura ambiente;

## PROTOCOLO DO TESTE DE ECLODIBILIDADE DE OVOS

- Proceder à recuperação dos ovos conforme protocolo anterior;
- Colocar aproximadamente 100 ovos/poço em placas de 24 poços;
- Adicionar os tratamentos fitoterápicos calculando o volume final por poço de 1 mL e 6 poços por concentração;
- Quantidade máxima de Tween 80: 90 µL/poço;
- Sugestão e exemplo para a produção das concentrações p/ 6 poços:

1	2	3	4	5	6	7
Concentração (%)	Tween 80 (µL) (30 X 6)	Extrato Vegetal (µL)	Ovos (µL X 6)	Soma (µL)	Subt. Vol. Final (µL)	Água Destilada (µL)
5	180	300	120	600	6000	5400
2,5	180	150	120	450	6000	5550
1,25	180	75	120	375	6000	5625
0,625	180	37,5	120	337,5	6000	5662,5
0,3125	180	18,7	120	318,7	6000	5681,3
0,156	180	9,4	120	309,4	6000	5690,6
0,078	180	4,7	120	304,7	6000	5695,3
Controle+	180	0	120	300	6000	5700
Controle-	0	0	120	120	6000	5880

- Adicionar em tubo a coluna 1, 2 e 6. Agitar em vórtex e inserir nos poços. Como cada poço já teria 20 µL de ovos, o volume do tubo dará para inserir 980 µL em cada um dos 6 poços;
- Quantidade máxima de Tween 80: 90 µL/poço. Dependendo do óleo essencial, talvez não haja necessidade de tanto;
- Identificar as placas e acondiciona-las em BOD de 27°C por 24 h;
- Realizar a leitura em microscópio invertido.

## PROCOTOLO DO TESTE DE MIGRAÇÃO DE LARVAS EM ÁGAR (modificado)

- Colher larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) de fezes de ovinos doadores: *Haemonchus contortus*;
- Adicionar 0.3% de hipoclorito de sódio para desembainhar as larvas (1h aproximadamente);
- Lavar as larvas 3x em água destilada por centrifugação (3000 rpm por 2 min.);
- Calcular a quantidade das larvas para grupos de 200 larvas por poço e em 6 repetições;
- Adicionar os tratamentos fitoterápicos calculando o volume final por poço de 1mL e 6 poços por concentração;
- Quantidade máxima de Tween 80: 90 µL/poço;
- Sugestão e exemplo para a produção das concentrações p/ 6 poços:

1	2	3	4	5	6	7
Concentração (%)	Tween 80 (µL) (30 X 6)	Extrato Vegetal (µL)	Larvas (µL X 6)	Soma (µL)	Subt. Vol. Final (µL)	Água Destilada (µL)
5	180	300	120	600	6000	5400
2,5	180	150	120	450	6000	5550
1,25	180	75	120	375	6000	5625
0,625	180	37,5	120	337,5	6000	5662,5
0,3125	180	18,7	120	318,7	6000	5681,3
0,156	180	9,4	120	309,4	6000	5690,6
0,078	180	4,7	120	304,7	6000	5695,3
Controle+	180	0	120	300	6000	5700
Controle-	0	0	120	120	6000	5880

- Adicionar em tubo a coluna 1, 2 e 6. Agitar em vórtex e inserir nos poços. Como cada poço já teria 20 µL de larvas, o volume do tubo dará para inserir 980 µL em cada um dos 6 poços;
- Colocar, após isto, 1 ml de solução de ágar a 1.4% a 45° C em cada poço (total 2 ml) e transferir imediatamente a solução ágar+solução com as larvas para um aparato previamente preparado\* utilizando uma pipeta de 5 ml;
- Colocar o aparato em incubadora a 27° C por 18h sob lâmpada de 150 MHz. O objetivo da luz é estimular a mobilidade das larvas para fora do gel;
- Após isto, transferir a porção líquida da solução para tubo Falcon de 50 ml com tampa. Centrifugar a 3000 rpm/5 min;

- Retirar uma alíquota de 2 mL do centrifugado dos tubos Falcon e transferir para cada poço em placas de 24 poços;
- Adicionar 200  $\mu$ L de Lugol em cada poço e realizar a leitura em microscópio invertido.

\* Preparo do aparato: placa de Petri, contendo uma malha plástica na base e uma malha com abertura menor sob esta e ainda um cilindro plástico com 2 cm de altura acima delas. Deve-se colocar 22 ml de água destilada e colocar o aparato completo (malhas + cilindro + água) no freezer para que a água feche as malhas no congelamento. Deve-se permitir que exista espaço no cilindro para colocar a solução final de 2 ml.



## PROTOCOLO DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

- Dissolver 1 mL de acetato de etila em 15 mg do óleo essencial;
- Inserir no injetor automático juntamente com a amostra padrão de hidrocarbonetos;
- Acionar o funcionamento do cromatógrafo obedecendo as seguintes especificações:
  - temperatura do injetor: 220°C
  - temperatura inicial da coluna capilar: 60°C
  - temperatura final da coluna capilar: 240°C
  - temperatura do detector de massas: 250°C
- Ajustar o fluxo de arraste do gás Hélio = 1 mL/minuto;
- Selecionar o impacto eletrônico a 70 elétron volts;
- Calcular os índices de retenção pela fórmula de Kovatz:

$$IR = \frac{[(t_{Rx} - t_{RCn-1}) \times (C_n - C_{n-1})] \times 100}{(t_{RCn} - t_{RCn-1})} + (100 \times C_{n-1})$$

Onde:

$t_{Rx}$  = Tempo de retenção do analito

$t_{RCn}$  = Tempo de retenção do hidrocarboneto com “n” carbonos

$t_{RCn-1}$  = Tempo de retenção do hidrocarboneto com “n-1” carbonos

$C_n$  = Número de carbonos do hidrocarboneto “n”

$C_{n-1}$  = Número de carbonos do hidrocarboneto “n-1”

## PROTOCOLO DO ENSAIO DA SULFORODAMINA B

Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem	Órgão/Doença	Origem Embrionária	Densidade de Inoculação (10 <sup>4</sup> cel/mL)
U251	SNC; glioma	Ectoderme	4,0
MCF-7	Mama; adedecarcinoma	Ectoderme	6,0
786-O	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme	5,0
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme	4,5
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme	7,0
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme	5,0
K562	Medula óssea; Leucemia mielóide crônica	Mesênquima	6,0
HaCaT	Pele (queratinócito)/Normal	Ectoderme	5,0

- Inocular 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc<sup>®</sup>), de cada suspensão celular, na densidade de inoculação descrita na tabela, em meio RPMI/5% SFB, acrescido de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL: 1000 µg/mL, 1mL/L RPMI);

- Incubar por 24h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>;

- Adicionar 100µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL);

Preparação das amostras:

- Dissolver uma alíquota de 10 mg de cada amostra em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe serão dispersos em 950 µL de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho;

- Diluir sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. A concentração final de DMSO não interfere no crescimento celular;

Para o controle positivo utilizar o quimioterápico Doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL. No momento da adição das amostras, realizar a fixação, com ácido tricloroacético (TCA) a 50%, da placa controle chamada T0;

Incubar por 48h;

Fixar as células com 50 µL/compartimento de TCA a 50% e incubar as placas por 1h a 4°C;

Lavar as placas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários;

Secar completamente, à temperatura ambiente;

Corar as células com 50 µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e manter as placas por 20 min a temperatura ambiente;

Lavar quatro vezes, com ácido acético 1% e secar à temperatura ambiente;

Adicionar Trizma Base (Sigma®) (10 µM e pH 10,5);

Realizar a leitura espectrofotométrica de absorbância em 540 nm em leitor de microplacas.